

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**DETERMINANTES GENÉTICOS NA FISIOPATOLOGIA DA ASMA**

**RIDHI RAMESHCHANDRA PRABHUDAS**

**DISSERTAÇÃO DO MESTRADO**

**MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA**

**2013**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**DETERMINANTES GENÉTICOS NA FISIOPATOLOGIA DA ASMA**

Dissertação orientada por:

Prof. Doutor Manuel Bicho, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e Instituto de  
Medicina Molecular

Prof. Doutor Pedro J.N. Silva, Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências  
da Universidade de Lisboa

**RIDHI RAMESHCHANDRA PRABHUDAS**  
**MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA**

**2013**



**Dedicado ao meu pai, minha mãe  
e ao meu querido irmão.**

## **AGRADECIMENTOS**

É com enorme orgulho que concluo esta etapa tão importante da minha vida, a qual só foi possível concretizar devido à contribuição e apoio de diversas pessoas a quem expresso a minha profunda gratidão.

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Doutor Manuel Bicho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Lisboa e Director do Laboratório de Genética, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pelo apoio concedido.

Ao Serviço de ImunoAlergologia do Hospital de Santa Maria, na pessoa da Doutora Margarida Cortez por me ter possibilitado desenvolver este trabalho e pela disponibilidade prestada.

Ao Professor Doutor Pedro J.N. Silva por toda a orientação e dedicação.

A todas as colaboradoras do laboratório de genética, nomeadamente as Doutoradas Joana Ferreira, Andreia Matos, Irina Alho, Técnica Conceição Afonso e Ângela Gil, por toda a ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Queria deixar um agradecimento especial à minha família, principalmente ao meu pai e à minha mãe por todo apoio, esforço e dedicação na minha educação; ao meu irmão por estes anos de convivência, a quem dedico este trabalho; aos meus avós, tios, tias, primos e primas, pelo apoio incondicional, sem vós não teria sido possível atingir este objectivo.

Queria agradecer aos meus amigos e colegas de vida académica, nomeadamente Krushila Kumar, Elizett Miguel e Tânia Costa pela amizade, convívio e pelas vivências experienciadas em conjunto.

Por fim, queria expressar um agradecimento muito especial aos colegas que se tornaram amigos: Cindy Castelão, Rui Reis e Stéphanie Castaldo, por toda a ajuda, disponibilidade, paciência e o convívio que proporcionaram momentos de gargalhada que permitiram descontraír nos momentos de desespero.

Um sincero Obrigado a todos.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1. Etiologia.....	1
2. Etiopatogenia da Asma .....	1
3. Óxido nítrico .....	4
3.1.Óxido nítrico e mecanismo de acção .....	4
3.2.Stresse Nitrante .....	7
4. Sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) .....	7
5. Mieloperoxidase .....	9
<b>OBJECTIVOS .....</b>	<b>10</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
1. Populações Estudadas.....	11
2. Extracção de DNA Genómico .....	11
3. Quantificação do DNA .....	11
4. PCR-RFLP .....	12
4.1.Polimorfismo NOS2 (Exão 16 – 14CT); (intrão 16 – 88GT) .....	12
4.2.Polimorfismo NOS2 (intrão 20 – IVS20 + 524 GA) .....	13
4.3.Polimorfismo MPO (-463 GA) .....	14
5. Determinação da concentração plasmática da MPO .....	15
6. Análise Estatística.....	15
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
1. Análise Descritiva da População .....	16
2. Análise do Polimorfismo NOS2 (exão 16 + 14C> T) .....	17
3. Análise do Polimorfismo NOS2 (intrão 16 + 88G> T) .....	18
4. Análise do Polimorfismo NOS2 (intrão 20 + 524G> A).....	19
5. Análise do Polimorfismo (G463A).....	20
6. Determinação da concentração plasmática da MPO .....	21

7. Interação Epistática entre o Polimorfismo MPO G463A e exão 16 + 14C> T da NOS2 .....	23
8. Interação Epistática entre o Polimorfismo MPO G463A e Intrão 20 + 525 G> A da NOS2 .....	24
9. Relação dos polimorfismos com o Tipo de Alergia e Níveis de controlo de Asma.....	25
<b>DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>CONCLUSÃO</b> .....	29
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	30
<b>ANEXOS</b> .....	35
Anexo I – Figuras Complementares .....	36
Anexo II – Tabela Complementar .....	39
Anexo III – Protocolo de extracção de DNA pelo método de <i>Salting-out</i> .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>%(m/v)</b>	Percentagem de massa de soluto por volume de solução
<b>A</b>	Adenina
<b>ACQ</b>	<i>Asthma Control Questionnaire</i>
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetrahidrobiopterina
<b>bp</b>	Pares de bases nucleotídicas
<b>C</b>	Citocina
<b>CCL11</b>	Proteína quimiotáctica de eosinófilos e eotaxina 1
<b>CD40</b>	Proteína co-estimuladora das células apresentadoras de antígeno
<b>cGMP</b>	Guanosina monofosfato cíclico
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloreto
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>EAR</b>	Resposta asmática precoce
<b>EDRF</b>	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>eNOS/NOSIII</b>	Sintase do óxido nítrico endotelial
<b>EPO</b>	Peroxidase eosinófila
<b>FAD</b>	Dinucleótido de flavina e adenina
<b>FcεRI</b>	Receptor IgE de alta afinidade para as cadeias pesadas ε
<b>Fe</b>	Ferro
<b>FEV<sub>1</sub></b>	Volume expiratório no 1º segundo (do inglês: <i>forced expiratory volume in 1 second</i> )
<b>FMN</b>	Mononucleótido de flavina
<b>G</b>	Guanina
<b>GINA</b>	<i>Global Initiative for Asthma</i>
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio
<b>HOCl</b>	Ácido hipocloroso



<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-13</b>	Interleucina 13
<b>INANC</b>	Inibitory nonadrenergic noncolinergic nerves
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferão gama
<b>iNOS/NOSII</b>	Sintase do óxido nítrico induzível
<b>kb</b>	Quilobase
<b>kDa</b>	Unidade de massa atômica
<b>LAR</b>	Resposta asmática tardia
<b>L-Arg</b>	Arginina
<b>Leu</b>	Leucina
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>ng</b>	Nanogramas
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>nNOS/NOSI</b>	Sintase do óxido nítrico neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrito
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrato
<b>NOS</b>	Sintase do óxido nítrico
<b>NOS2</b>	Sintase do óxido nítrico induzível
<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superóxido
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>OR</b>	<i>Odds Ratio</i>
<b>p</b>	<i>p-value</i>
<b>PCR</b>	Reacção em cadeia da polimerase (do inglês: <i>polymerase chain reaction</i> )

<b>PEF</b>	Débito expiratório máximo instantâneo (do inglês: <i>peak expiratory flow</i> )
<b>pH</b>	Potencial de Hidrogénio
<b>PMN</b>	Leucócitos polimorfonucleares
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (do inglês: <i>restriction fragment lenght polymorphism</i> )
<b>RNS</b>	Espécies reactivas de nitrogénio ou azoto
<b>ROS</b>	Espécies reactivas de oxigénio
<b>rs</b>	Posição relativa
<b>RSNO</b>	S-nitrosotóios
<b>Ser</b>	Serina
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido único (do inglês: <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>SP1</b>	<i>specificity protein 1</i>
<b>T</b>	Timina
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>TCR</b>	Receptores de células T
<b>TE</b>	Tris-EDTA-pH=8
<b>TGF-β</b>	Factor de transformação do crescimento beta
<b>Th0</b>	Células T <i>naïve</i>
<b>Th1</b>	Células T auxiliadoras (helper) tipo 1
<b>Th2</b>	Células T auxiliadoras (helper) tipo 2
<b>TLR4</b>	Receptores Toll-like 4 (do ingles: <i>Toll-like receptor 4</i> )
<b>TNF-α</b>	Factor de necrose tumoral alfa
<b>U</b>	Unidades
<b>V</b>	Volts
<b>VEGF</b>	Factor de crescimento vascular endotelial
<b>μl</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>pmol</b>	Picomol
<b>χ<sup>2</sup></b>	Qui-Quadrado

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática da cascata inflamatória da asma alérgica.....	3
<b>Figura 2</b> – Reacção da Sintase do óxido nítrico .....	5
<b>Figura 3</b> – Imagem esquemática do gene que codifica a sintase do óxido nítrico induzível ....	8
<b>Figura 4</b> – Imagem da estrutura do gene MPO e localização do polimorfismo G463A .....	9
<b>Figura 5</b> – Perfil electroforético dos fragmentos do gene NOS2 (exão 16).....	13
<b>Figura 6</b> – Perfil electroforético dos fragmentos do gene NOS2 (intrão 16) .....	13
<b>Figura 7</b> – Perfil electroforético dos fragmentos do gene NOS2 (intrão 20) .....	14
<b>Figura 8</b> – Perfil electroforético dos fragmentos do gene NOS2 MPO .....	14
<b>Figura Suplementar 1</b> – Questionário ACQ (Asthma Control Questionnaire) .....	36
<b>Figura Suplementar 2</b> – Localização do gene NOS2 no cromossoma 17 .....	37
<b>Figura Suplementar 3</b> – Localização do gene MPO no cromossoma 17.....	37
<b>Figura Suplementar 4</b> – Concentração da MPO nas populações dos doentes asmáticos e o grupo controlo .....	37
<b>Figura Suplementar 5</b> – Associação entre o polimorfismo da MPO e a concentração enzimática nos doentes asmáticos .....	38
<b>Figura Suplementar 6</b> – Associação entre o polimorfismo da MPO e a concentração enzimática no grupo controlo .....	38

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Genes das isoformas NOS nos humanos .....	6
<b>Tabela 2</b> – Distribuição do sexo e idade nas populações em estudo .....	17
<b>Tabela 3</b> – Frequência genotípicas e alélicas do polimorfismo exão 16 + 14C> T no grupo de controlo e nos doentes asmáticos .....	17
<b>Tabela 4</b> – <i>Odds Ratio</i> para a associação entre os genótipos do polimorfismo exão 16 + 14G> T .....	18
<b>Tabela 5</b> – Frequência genotípicas e alélicas do polimorfismo intrão 16 + 88G> T no grupo de controlo e nos doentes asmáticos .....	19
<b>Tabela 6</b> – Frequência genotípicas e alélicas do polimorfismo intrão 20 + 524G> A no grupo de controlo e nos doentes asmáticos .....	19
<b>Tabela 7</b> – <i>Odds Ratio</i> para a associação entre os genótipos do polimorfismo intrão 20 + 524G> A.....	20
<b>Tabela 8</b> – Frequência genotípicas e alélicas do polimorfismo MPO G463A no grupo de controlo e nos doentes asmáticos .....	20
<b>Tabela 9</b> – <i>Odds Ratio</i> para a associação entre os genótipos do polimorfismo MPO G463A .....	21
<b>Tabela 10</b> – Concentração da MPO para a população de doentes asmáticos e o grupo controlo .....	22
<b>Tabela 11</b> – Associação entre os genótipos da MPO e a concentração enzimática nas duas populações .....	22
<b>Tabela 12</b> – Relação da concentração da MPO com os níveis de controlos de asma e o tipo de asma .....	23
<b>Tabela 13</b> – Associação entre o polimorfismo MPO G463A e exão 16 + 14C> T da NOS2. .....	23
<b>Tabela 14</b> – Associação entre o polimorfismo MPO G463A e intrão 20 + 534 G> A da NOS2 .....	24
 <b>Tabela Suplementar 1</b> – Relação dos diferentes polimorfismos com os níveis de controlo de asma e o tipo de asma .....	 39

## RESUMO

A asma é um grave problema de saúde pública a nível mundial que apresenta uma elevada morbilidade.

Apresentando uma interacção complexa de diversos factores, a asma é uma doença inflamatória crónica das vias respiratórias caracterizada por uma obstrução brônquica reversível que desencadeia episódios recorrentes de pieira, aperto torácico e tosse.

O óxido nítrico desempenha um papel importante na regulação fisiológica da função das vias respiratórias e está implicada na doença das vias aéreas, como a asma.

Os estudos genéticos permitem associar os polimorfismos ao risco de desenvolvimento da doença em estudo. Os estudos bioquímicos permitem verificar se existem enzimas, biomarcadores circulantes, cujas alterações ao nível da sua concentração sejam o reflexo de qualquer distúrbio no metabolismo e mecanismos de acção que afecte o desenvolvimento da doença. Assim o principal objectivo deste trabalho consistiu no estudo dos polimorfismos exão/intrão 16 e intrão 20 do gene da sintase do óxido nítrico induzível, uma enzima envolvida na formação do NO e o polimorfismo G463A do gene da mieloperoxidase que está envolvida na variabilidade dos seus níveis circulantes e como tal na biodisponibilidade do NO e desenvolvimento da asma.

Os resultados demostram que os genótipos CT/TT do polimorfismo exão 16 da iNOS e o genótipo GG do polimorfismo intrão 20 da iNOS podem estar associados a uma maior susceptibilidade de desenvolver asma.

Em relação ao polimorfismo MPO G463A, os genótipos GA/AA estão associados a uma maior susceptibilidade de desenvolver asma. Existe ainda uma diferença significativa entre o polimorfismo da MPO com a concentração da enzima entre os doentes asmáticos e o grupo controlo.

A interacção epistática entre os genótipos GA/AA da MPO associados aos genótipos CT /TT do polimorfismo exão 16 apresentam um grande factor de risco, assim como o genótipo GA/AA da MPO associado ao homozigótico (GG) do intrão 20, quando comparados individualmente.

**Palavras-chave:** Asma, óxido nítrico, polimorfismo, sintase do óxido nítrico induzível, mieloperoxidase.

## ABSTRACT

In terms of world wise, asthma is a big health public issue and it represents a high morbidity.

Representing complex interaction of several factors, asthma is an inflammatory chronic disease of the respiratory system which is characterized by a reversible bronchial obstruction and which triggers recurrent episodes of wheezing, chest tightness and coughing.

The nitric oxide plays an important role in the physiological function of the airways and it's implicated in airway disease, such as asthma.

A genetic study allows association between polymorphisms and the risk of developing the disease under study. Biochemical studies determines whether there are enzymes, circulating biomarkers, whose changes on its level are a reflection of any disturbances in metabolism and mechanisms of action that affects the development of the disease. Thus the main aim of this work was to study the exon/intron 16 and intron 20 polymorphism of the gene of inducible nitric oxide synthase (iNOS), an enzyme involved in the formation of NO and the polymorphism G463A of myeloperoxidase (MPO) gene which is involved in NO bioavailability. Also we studied its circulating levels related to polymorphism.

The results show that the genotypes CT/TT polymorphism of the exon 16 of iNOS and genotype GG of the polymorphism intron 20 of iNOS, may be associated with a greater susceptibility to develop asthma.

In relation of the polymorphism G463A MPO, the genotypes GA/AA are associated with a greater susceptibility to develop asthma, as well. There are still significance differences between the MPO polymorphism with the enzyme concentrations between asthmatic patients and control group.

The epistatic interaction between the genotype GA/AA of MPO associated with genotypes CT/TT polymorphism of iNOS exon 16, presents the most significant risk factor, as well as the genotypes GA/AA MPO associated with homozygous (GG) of intron 20 when individually compared.

**Keywords:** Asthma, nitric oxide, polymorphism, inducible nitric oxide synthase, myeloperoxidase.

# INTRODUÇÃO

A asma, uma patologia do sistema respiratório, é um grave problema de saúde pública a nível mundial e que apresenta uma elevada morbilidade.

Representando uma interacção complexa de diversos factores, a asma é uma doença crónica que se caracteriza pela inflamação das vias respiratórias, na qual determinados tipos de células (*e.g.* mastócitos, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos) e elementos celulares desempenham um papel activo. A inflamação crónica associada a uma hiper-reactividade das vias respiratórias causa episódios recorrentes de pieira, falta de ar, aperto no peito e tosse. Estes episódios estão normalmente associados a uma obstrução generalizada mas variável, do fluxo de ar, frequentemente reversível quer espontaneamente ou com tratamento (National Heart, Lung and Blood Institute 2007).

A palavra asma é derivada da palavra grega *azein* que significa “respirar com dificuldade” (Clark, M. 2011), tendo a doença sido documentada há muito tempo e referida pela primeira vez por Hipócrates na Grécia Antiga (Dupuy *et al.*, 1992).

Actualmente, a asma afecta cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo e causa aproximadamente 18000 mortes anualmente embora se tenha verificado um decréscimo nas taxas de mortalidade a partir dos anos 80 (WHO 2007). Com o aumento da população urbanizada prevê-se um acréscimo significativo nas próximas décadas no número de pessoas com asma, estimado em 100 milhões de pessoas para 2025 (Masoli *et al.*, 2004). Em Portugal estima-se que a prevalência de asma seja de cerca de 10%, afectando aproximadamente 1 milhão de portugueses (Bugalho de Almeida 2010).

## 1. ETIOLOGIA

A asma é uma doença heterogénea onde vários factores de risco estão associados à sua origem, tais como, factores genéticos (*e.g.* predisposição genética), factores ambientais como o contacto com os alérgenos (*e.g.* ácaros, pólen e fármacos), infecções virais, poluentes atmosféricos (*e.g.* principalmente o ozono) e factores endógenos (*e.g.* atopia) (Bloemen *et al.*, 2007). A sua complexidade genética deve-se à interacção de variantes de múltiplos genes que estão envolvidos na sua patogénese (Meng & Rosenwasser, 2010).

## 2. ETIOPATOGENIA DA ASMA

A inflamação das vias respiratórias é uma característica fisiopatológica dominante na asma, que envolve várias células do sistema imunitário e múltiplos mediadores químicos que

estão associados à broncoconstrição resultante da hiper-reatividade das vias aéreas e da hipersecreção do muco (National Heart, Lung and Blood Institute, 2007; Silkoff *et al.* 2005; Holgate, Stephen T., 2008). O padrão de inflamação varia consideravelmente e depende da gravidade da asma: intermitente e persistente ligeira, moderada e grave. (Busse & Lemanske, 2003).

A asma pode ser dividida em asma alérgica e não alérgica, que se distinguem pela presença ou ausência de anticorpos IgE a alergénios ambientais comuns. No entanto, em ambas as formas da doença, as vias aéreas são infiltradas pelos eosinófilos, mastócitos e células T-helper (Th) que secretam predominantemente citocinas, como a interleucina 4 (IL-4), IL-5 e IL-13 características das células T auxiliaadoras (helper) tipo 2 (Th2), em detrimento de uma resposta por Th1 (Meng & Rosenwasser, 2010).

Na asma alérgica, os alergénios são reconhecidos pelas células dendríticas (DCs), presentes na mucosa respiratória e apresentam o antigénio, estabelecendo uma ligação através do complexo MHC Classe II ao receptor da célula T (TCR) de uma célula Th *naive* (Th0). As DCs libertam citocinas, especialmente a interleucina 4 (IL-4) que provoca a diferenciação e a expansão de células Th0 em células Th2 (Pelaia *et al.*, 2012). As células Th2 activadas libertam citocinas, principalmente as IL-4, IL-13 e o ligando CD40, este último liga-se ao seu receptor (CD40) presente nas células B (National Heart, Lung and Blood Institute 2007). Esta ligação conjuntamente com a IL-4 aos receptores das células B onde induz a mudança de isótopo de cadeia pesada ( $\epsilon$ ) e a diferenciação em plasmócitos que produzem elevadas quantidades de imunoglobulina E (IgE). Por sua vez, os anticorpos IgE ligam-se ao receptor Fc de alta afinidade para as cadeias pesadas  $\epsilon$  (Fc $\epsilon$ RI), expresso em mastócitos, eosinófilos e basófilos (Bloemen *et al.*, 2007; Holgate, Stephen T., 2008). A resposta asmática precoce (EAR) subsequente à exposição dos alergénios induz a desgranulação destas células e a libertação de moléculas pró-inflamatórias e espécies reactivas de oxigénio (Cookson, W., 2004) que conduzem ao aumento da broncoconstrição como consequência da contracção do músculo liso brônquico (*e.g.* broncospasmo) e inflamação da mucosa respiratória (*e.g.* edema das vias respiratórias) (Benson *et al.*, 2011).

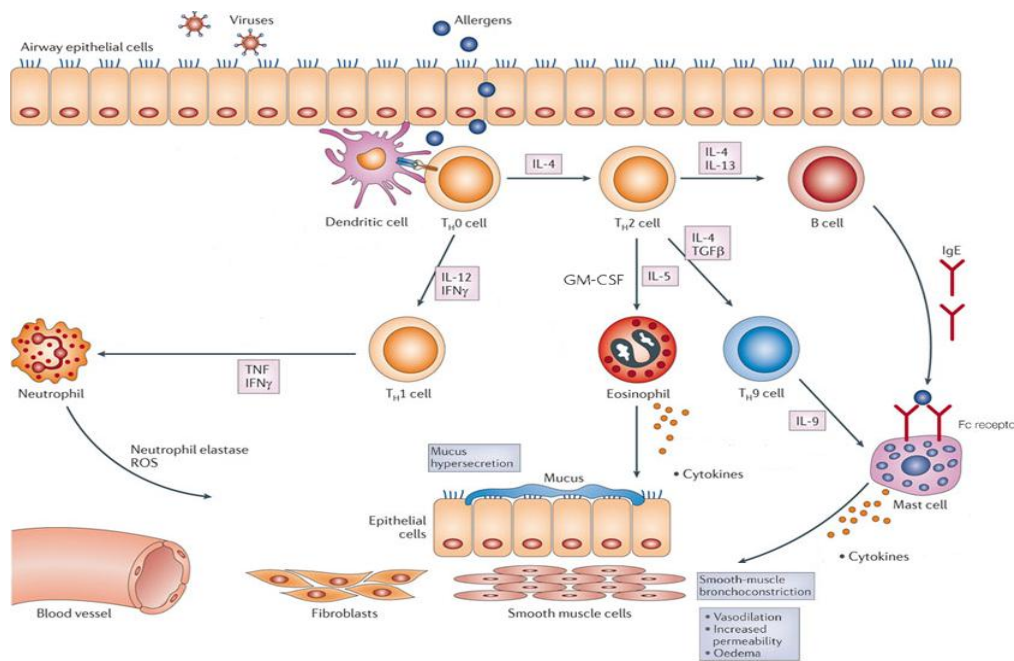
A resposta asmática tardia (LAR) ocorre 3 a 9 horas após o contacto com o alergénio e caracteriza-se pelo recrutamento e activação de eosinófilos, células T CD4<sup>+</sup>, neutrófilos e macrófagos.

Os eosinófilos infiltram a mucosa brônquica e fixam IgE na sua membrana onde libertam vários mediadores em resposta ao contacto com o alergénio sendo o seu recrutamento dependente das citocinas IL-5, IL-13 e GM-CSF (factor estimulador de colónias



de granulócitos e macrófagos) assim como da quimiocina eotaxina (CCL11), que actuam aumentando o recrutamento e a expressão das suas moléculas de adesão (Benson *et al.*, 2011).

Os neutrófilos também têm um papel importante na resposta asmática tardia, onde os seus produtos, tais como, as citocinas (interferão  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), factor de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1 e IL-6), a enzima mieloperoxidase e o óxido nítrico, provocam espasmo no músculo liso das vias aéreas e a hipersecreção do muco (Figura 1) (Bloemen *et al.*, 2007).



**Figura 1 - Representação esquemática da cascata inflamatória da asma alérgica.** A resposta imune na asma começa com o contacto entre as células apresentadoras de antígeno (principalmente DCs) e o alérgeno. Estas células estimulam a diferenciação de células Th *naive* em Th1 e Th2. A IL-4 secretada pelas células Th2 promove a produção de IgE pelos linfócitos B. A IgE liga-se a receptores de alta afinidade em mastócitos e basófilos e irá permitir uma resposta imediata. Após este contacto, os mediadores libertados pelos mastócitos, vão induzir o recrutamento e activação de outros tipos de células do sistema imunitário, tais como eosinófilos, macrófagos alveolares e as células estruturais. Este tipo de células promove a resposta tardia que não está presente em todos os indivíduos asmáticos. Essas células não só promovem a resposta inflamatória, mas também provoca hiper-reatividade, broncoconstrição e remodelação. (Adaptado de Pelaia *et al.*, 2012).

Além das células imunitárias, o epitélio das vias respiratórias desempenha um papel fundamental na patogénese da asma. Um aumento na permeabilidade do epitélio asmático conduz a um maior acesso de alérgenos inalados para as células basais e tecidos subjacentes das vias aéreas, levando a um aumento da libertação de citocinas pró-inflamatórias, o que contribui para a hiper-reatividade das vias respiratórias (Holgate, Stephen T., 2008).

A inflamação persistente das vias respiratórias, associado à perda progressiva da função pulmonar, resulta na remodelação do tecido pulmonar respiratório. A remodelação das vias respiratórias envolve a activação de uma série de células estruturais (*e.g.* células epiteliais, células do músculo liso e células endoteliais) que origina alterações na estrutura da sua parede, tais como, a obstrução do fluxo de ar que resulta numa condição de hipoxia no tecido pulmonar afectado. Estas alterações estruturais resultam na hipertrofia e hiperplasia do músculo liso das vias aéreas, a deposição de colagénio e angiogénese (Busse & Lemanske, 2003).

A angiogénese associada à hipoxia, um dos principais componentes do processo de remodelação, é regulada principalmente pelo factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), TGF  $\beta$  e pela sintase do óxido nítrico induzível (NOS II).

### **3. ÓXIDO NÍTRICO**

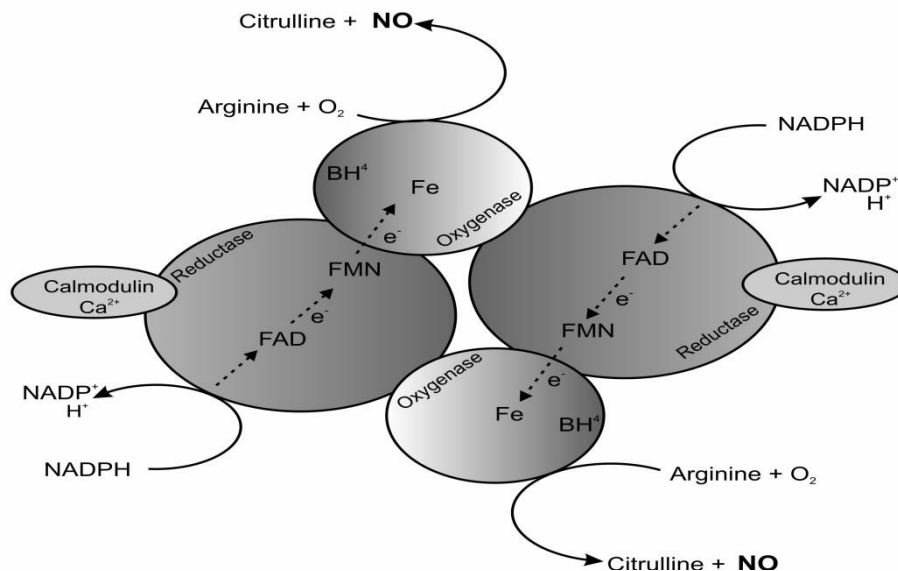
O óxido nítrico é um gás inorgânico e um radical livre, de fórmula química NO (Qidwai, T. & Jamal, F., 2010; Knowles, R.G. & Moncada, S., 1994). O NO desempenha um papel importante no mecanismo de defesa pulmonar do hospedeiro, tendo efeitos anti microbicidas contra uma variedade de agentes patogénicos. Nas doenças inflamatórias é detectada uma elevada produção de NO pelas células epiteliais, que agem como uma barreira importante na invasão do sistema respiratório pelos microrganismos inalados (Qidwai, T. & Jamal, F., 2010).

O NO possui um tempo de semi-vida curto (3 a 20s) (Singh *et al.*, 2000), contendo um electrão desemparelhado e permite a reacção contra as espécies reactivas de oxigénio (ROS), tais como, peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e superóxido ( $\bullet O_2^-$ ) (Bonavida *et al.*, 2006). É uma molécula de sinalização ubíqua envolvida na regulação de diversas funções biológicas incluindo actividades do sistema imunitário. (Abu-saud, H.M. & Hazen, S.L., 2000).

#### **3.1. ÓXIDO NÍTRICO E MECANISMO DE ACÇÃO**

A síntese do óxido nítrico resulta da oxidação de cinco electrões de azoto guanidino terminal do aminoácido L-arginina (L-arg) que é convertido em NO e L-citrulina, sendo a reacção catalisada pela família de enzimas designada por Sintase do Óxido Nítrico (NOS). A enzima NOS é activa como homodímero e o domínio oxigenase N-terminal é responsável pela sua dimerização. A formação da NOS activa também requer a ligação de duas moléculas de calmodulina, originando a NOS tetramérica. O domínio oxigenase contém dois locais de

ligação para co-factores tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) e protoporfirina IX de ferro (heme). O domínio redutase C-terminal está ligado por um local de reconhecimento de calmodulina ao domínio oxigenase que contém locais de ligação para nucleótidos de flavinas (FAD, FMN) e NADPH (Figura 2) (Singh *et al.*, 2000; Ghosh, S. & Erzurum, S.C., 2011; Billiar, T.R. & Morris, S.M., 1994; Alderton *et al.*, 2001).



**Figura 2 – Reacção da sintase do óxido nítrico.** NOS catalisa a produção de NO e L-citrulina a partir de L-arginina, oxigénio molecular e NADPH. NOS activa é tetrâmero, que contém NOS como um dímero e duas moléculas de calmodulina. Os co-factores FAD e FMN estão ligados ao domínio redutase enquanto  $BH_4$  e Fe estão ligados ao domínio oxigenase (adaptado de Ghosh, S. & Erzurum, S.C., 2011).

Em humanos, existem pelo menos três isoformas da NOS, que diferem relativamente à célula de origem e função fisiológica, sendo expressa no epitélio das vias aéreas (Salam *et al.*, 2011). As duas isoformas constitutivas NOS I e NOS III, originalmente identificadas em células neuronais e endoteliais respectivamente, são reguladas pelo cálcio e pela calmodulina e são responsáveis pela libertação basal de NO (Xu, W. *et al.*, 1996; Heltianu, C. *et al.*, 2011).

A forma induzível da NOS (iNOS/NOS II) é produzida por macrófagos, linfócitos T, neutrófilos, células do músculo liso e fibroblastos. A transcrição da iNOS é activada após estimulação por endotoxinas bacterianas (e.g. Lipopolissacáridos) activando receptores Toll-like 4 (TLR4), oxidantes ou por citocinas pró-inflamatórias (e.g.  $TNF-\alpha$ ,  $INF-\gamma$ ,  $IL-1\beta$ ), é regulada transcricionalmente e a sua actividade é independente dos níveis de cálcio intracelular devido à sua ligação de alta afinidade com a calmodulina (Lee, Kyoung-Mu *et al.*, 2009; Knowles, R.G. & Moncada, S., 1994; Mori, Masataka, 2007; Nevin, B.J. & Broadley K.J., 2002; Xu, W. *et al.*, 1996). A sua actividade é mais lenta que a eNOS mas é capaz de

produzir níveis elevados de NO num estado inflamatório, embora a sua produção continue indefinidamente até que a L-arginina ou os co-factores necessários para a sua síntese se esgotem (Dusse *et al.*, 2003).

**Tabela 1** – Genes das isoformas NOS nos humanos (adaptado de Ghosh & Erzurum 2011)

Isoformas	Localização cromossómica	Expressão	Actividade
nNOS/NOSI	12q24 do cromossoma 12	Constitutiva	Ca <sup>2+</sup> dependente
iNOS/NOSII	17cen-q12 do cromossoma 17	Induzível	Ca <sup>2+</sup> independente
eNOS/NOSIII	7q35-36 do cromossoma 7	Constitutiva	Ca <sup>2+</sup> dependente

O NO, sintetizado pelo NOSII, é um mecanismo que causa a amplificação asmática através da inibição das células Th1 que produzem INF- $\gamma$ , resultando no aumento de células Th2, uma característica fundamental da asma (Singh *et al.*, 2000).

Altas concentrações de NO actuam como um agente tóxico para organismos infecciosos, como indutor de apoptose ou como imunoregulador de resposta Th1/Th2 (Martín *et al.*, 2007).

O NO é conhecido como uma molécula que medeia várias funções fisiológicas e fisiopatológicas na asma. Um dos efeitos do NO é a broncodilatação onde existem evidências que o NO funciona como neurotransmissor dos nervos INANC (*inhibitory nonadrenergic noncolinergic nerves*) através da activação da guanilato ciclase solúvel do músculo liso das vias respiratórias, que catalisa a síntese monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) a partir trifosfato de guanosina (GTP), promovendo o seu relaxamento. Para além do seu papel como broncodilatador, o NO funciona como vasodilatador, previne a agregação de plaquetas às células endoteliais e está associado à modulação da permeabilidade vascular (Bonavida *et al.*, 2006; Dekkers *et al.*, 2009; Maarsingh *et al.*, 2009).

Robert Furchgott e colaboradores, 1980 descobriram que o efeito relaxante da acetilcolina na parede vascular foi atribuído à libertação de um factor difusível do endotélio designado por factor de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (Furchgott & Zawadzki, 1980). Actualmente, sabe-se que o endotélio dos vasos sanguíneos liberta óxido nítrico, o que leva o músculo liso a relaxar, provocando a vasodilatação e consequentemente o aumento do

fluxo sanguíneo na microcirculação das vias respiratórias (Ignarro *et al.*, 1987; Radomski *et al.*, 1987).

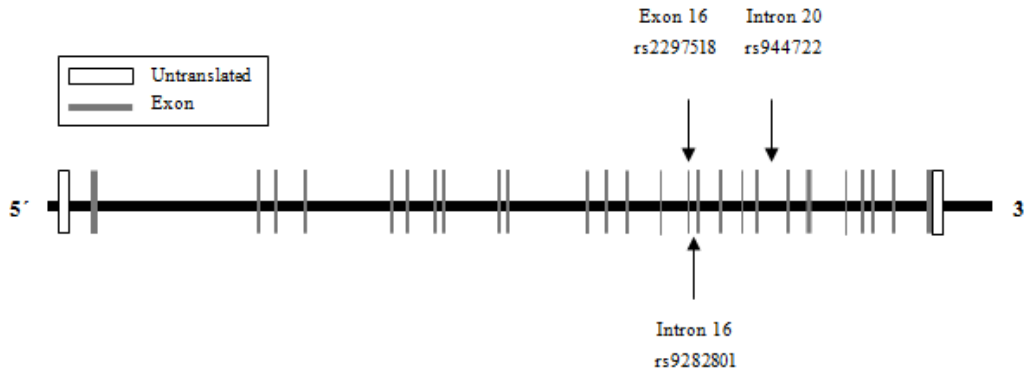
### 3.2. STRESSE NITRANTE

As espécies reactivas de nitrogénio (RNS) em conjunto com as espécies reactivas de oxigénio (ROS), produzidas através da actividade enzimática da iNOS, podem tornar-se tóxicas para o organismo criando um stresse nitrativo.

O óxido nítrico é oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) que, por sua vez, pode ser oxidado a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), formar S-nitrosotióis (RSNO) na presença de tióis ou promover a halogenação e/ou nitração de proteínas através do sistema mieloperoxidase (MPO)/peroxidase eosinófila (EPO), na presença de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e/ou haletos (Ghosh & Erzurum 2011). O NO reage com o anião superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), um agente altamente reactivo de semi-vida curta, originando uma inflamação das vias aéreas associado à remodelação das vias aéreas (Ghosh S. & Erzurum S.C., 2011; Islam T. *et al.*, 2010).

### 4. SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO INDUZÍVEL (iNOS)

A sintase do óxido nítrico induzível é expressa no epitélio das vias aéreas em resposta a citocinas pró-inflamatórias onde gera NO, que desempenha importantes funções nas vias respiratórias, tais como, inflamação aguda e crónica. O gene que codifica a enzima NOS2 designa-se por NOS2A e encontra-se no braço longo do cromossoma 17q11.2-12 (Figura suplementar 2 – Anexo I). Consiste em 27 exões que abrangem 37 Kb e codifica uma proteína de 131 kDa (1145 aminoácidos) (Heltianu C. *et al.*, 2011). O gene iNOS tem um local de início de transcrição no exão 2 e um codão stop no exão 27, apresentando dois diferentes domínios catalíticos funcionais, o domínio oxigenase codificado pelos exões 1-13 e domínio redutase pelos exões 14-26 (Qudwai, T. & Jamal, F., 2010; Xu Weiming *et al.*, 1996).



**Figura 3 – Imagem esquemática do gene que codifica a sintase do óxido nítrico induzível.** O gene NOS2 está localizado no cromossoma 17q11.2-12 e é composto por 27 exões. As regiões não traduzidas são marcadas com caixa branca e os exões marcados pelas caixas cinzentas. SNPs estudados são identificados pelas setas, com SNP designado pelo número rs ou posição relativa (adaptado de Velez *et al.*, 2009).

Até à data, foram identificados e avaliados vários polimorfismos neste gene, que estão associados a várias doenças para além da asma.

Relativamente a este projecto vão ser estudados os polimorfismos Intrão 20 + 524 G>A (rs944722), Intrão 16 + 88 G>T (rs9282801) e Exão 16 + 14C>T; Ser608Leu (rs2297518).

Um dos polimorfismos funcionais com relevância para a actividade da enzima iNOS constitui uma transição de C para T localizada no exão 16 (posição 2087) e que origina uma substituição do aminoácido serina por leucina no codão 608 (Ser608Leu). Esta variação aumenta a expressão da enzima nas células alvo, resultando em níveis elevados de NO, sendo responsável pela susceptibilidade/gravidade de várias doenças (Li Chunying *et al.*, 2007; Yoo Koo Han *et al.*, 2010; Jorge *et al.*, 2010).

Os outros polimorfismos envolvidos no metabolismo do NO são uma transição de T para G no intrão 16 (rs9282801) e uma transição de G para A no intrão 20 (rs944722) (Heltianu C. *et al.*, 2011). Sobre estes SNPs não se conhece ainda uma acção clara, mas é possível que afectem o *splicing*/expressão do gene ou aumentem a actividade da NOS2 e síntese de NO (Jorge *et al.*, 2010; Lee, Kyoung-Mu *et al.*, 2009).

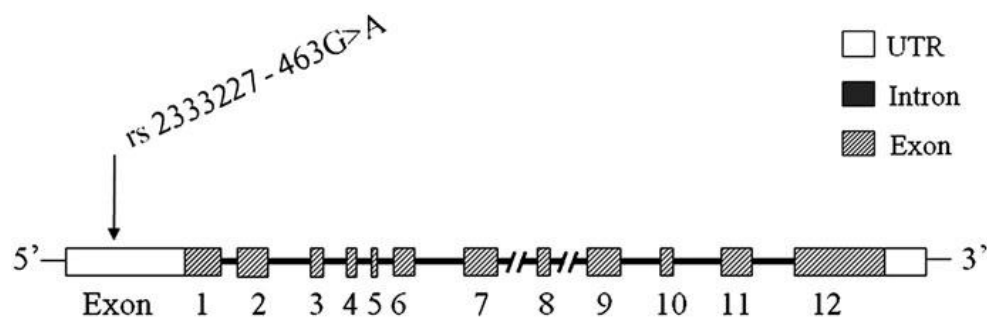
## 5. MIELOPEROXIDASE (MPO)

A Mieloperoxidase é um enzima lisossómico, expressa predominantemente nos grânulos azurófilos primários de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e, em menor quantidade por monócitos e macrófagos, nos locais de inflamação, durante a fagocitose (Kämpe *et al.*, 2011; Polonikov *et al.*, 2009; Podrez *et al.*, 2000).

A enzima é homotetramérica de 150 kDa que contém heme, em que cada monómero consiste numa subunidade pesada (55-64 kDa) e uma leve (10-15 kDa) (Lau, D. & Baldus, S., 2006; Podrez *et al.*, 2000).

A Mieloperoxidase catalisa a reacção entre o peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o anião de cloreto (Cl<sup>-</sup>) originando ácido hipocloroso (HOCl) e outros ROS que em situações fisiológicas conduzem à actividade bactericida contra uma ampla variedade de microrganismos durante a resposta imune inata (Polonikov *et al.*, 2009). A MPO e os seus produtos reactivos associados ao stresse oxidante, conduzem à modificação oxidativa de bases de DNA e inibem mecanismos de reparação de DNA (Chu *et al.*, 2010; Marchand *et al.*, 2000).

Em humanos, esta enzima é codificada pelo gene MPO no braço longo do cromossoma 17q23.1 (Figura suplementar 3 – Anexo I) e consiste em 12 exões e 11 intrões (Figura 4) (Chu *et al.*, 2010).



**Figura 4 – Imagem da estrutura do gene MPO e localização do polimorfismo G463A (rs2333227).** O gene MPO humano está localizado no cromossoma 17q23.1 e é composto por 12 exões e 11 intrões. Os intrões estão marcados com caixa preta e os exões marcados pelas caixas cinzentas. (adaptado de Chu Haiyan *et al.*, 2010).

O polimorfismo mais comum -463G> A (rs2333227) foi identificado a 463pb a montante do gene de MPO na região promotora, onde se liga o factor de transcrição SP1 (*specificity protein 1*) (Chu Haiyan *et al.*, 2010).

O alelo G funciona como um local de ligação do factor de transcrição de uma forte proteína estimuladora 1, o qual reage com o SP1 para aumentar a actividade transcripcional de MPO, enquanto a mudança de base de nucleótido G para A está associada a uma diminuição da ligação SP1 e, portanto uma menor actividade transcripcional de MPO (Feyler *et al.*, 2002; Polonikov *et al.*, 2009). A baixa actividade do alelo A foi associado a uma menor produção de ROS, diminuindo a incidência de várias doenças, nomeadamente as doenças cardiovasculares e cancro do pulmão (Lau, D. & Baldus, S., 2006; Feyler *et al.*, 2002).

## OBJECTIVOS

Este trabalho teve como objectivos:

1. Estudar a influência de polimorfismos genéticos relativos a biodisponibilidade do óxido nítrico, da sintase do óxido nítrico induzível (NOS2) e da mieloperoxidase (MPO) na fisiopatologia da asma, nomeadamente na progressão e na gravidade da doença.
2. Estudar a associação do polimorfismo genético do gene da MPO com a concentração desta enzima e com a susceptibilidade para o desenvolvimento da asma.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. POPULAÇÕES ESTUDADAS**

Neste estudo foram utilizadas 151 amostras de sangue provenientes de doentes com asma, que assinaram o respectivo consentimento informado, seguidos no Serviço de ImunoAlergologia do Hospital de Santa Maria – Centro Hospitalar Lisboa Norte, pela Doutora Margarida Cortez.

O diagnóstico da asma foi classificado de acordo com as linhas de orientação do *Global Initiative for Asthma* (GINA), tendo em conta a natureza episódica dos sintomas dispneia, pieira recorrente, tosse com agravamento noturno, dificuldade respiratória recorrente, aperto torácico recorrente e cansaço. Além disso, foi tida em consideração a história familiar de asma e a presença de outras doenças atópicas frequentemente associadas à asma. Em todos os casos recorreu-se a técnicas de avaliação funcional respiratória (FEV<sub>1</sub> e PEF) para confirmar o diagnóstico de asma.

Excluíram-se os doentes que, tendo sido diagnosticada asma, possuíam igualmente anemia, doença hepática, infecciosa ou oncológica, fumadores, com outra doença respiratória que não asma e os não aderentes à terapêutica.

A classificação do doente como asma controlada ou não controlada foi realizada através de um inquérito ACQ7 (Asthma Control Questionnaire) (Figura suplementar 1 – Anexo I) (Juniper *et al.*, 1999) em que o cut-point considerado é o da prática clínica 0,75 (para os que tiverem idade superior a 17 anos).

Como grupo controlo foram utilizadas 213 amostras de dadores de sangue saudáveis provenientes do Instituto Português do Sangue, Lisboa e que não apresentam a doença.

### **2. EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO**

As amostras de sangue total foram colhidas em tubos de 10 ml com EDTA e guardadas a -4°C. O DNA foi obtido a partir de 2 ml de sangue, usando um método não enzimático designado de *salting-out*, adaptado do método de D. K. Lahiri e J. I. Nurnberger Jr. (1991) (Nucleic Acid research volume 19 nº 19 pag.5444) que pode ser consultado no Anexo III.

### **3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA**

A quantificação (ng/μl) e determinação da pureza do DNA genómico foram determinadas por método espectrofotométrico aos comprimentos de onda de 260 e 280 nm

(NanoDrop® ND-2000). O DNA foi solubilizado em tampão TE (Tris EDTA pH=8) e conservado a 4 °C.

#### 4. PCR-RFLP

A amplificação do DNA foi conseguida através do método de PCR (*Polimerase Chain Reaction*). A amplificação dos genes foi realizada no termociclador Gene Amp® PCR System 2700 com diferentes condições de PCR para cada gene conforme descrito abaixo.

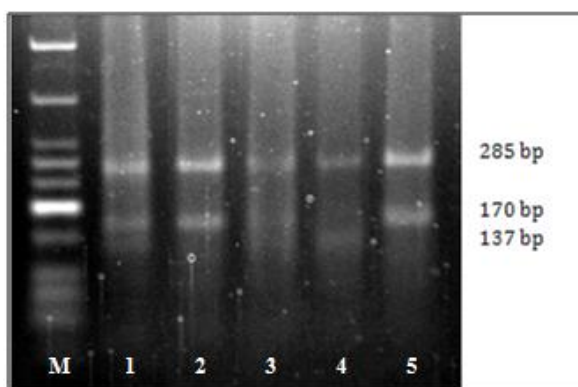
Para os polimorfismos dos genes iNOS (ex/int16 e intrão 20) e MPO a genotipagem dos indivíduos foi efectuada por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), uma técnica de restrição enzimática que permite a discriminação dos alelos após separação por electroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) num volume de 50 ml de TAE (20mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH8,0) com adição de brometo de etídeo (10 mg/ml) sob uma corrente eléctrica.

A visualização das bandas de DNA, após todas as eletroforeses, foi efectuada num transiluminador de ultravioleta (Geno Smart VWR®).

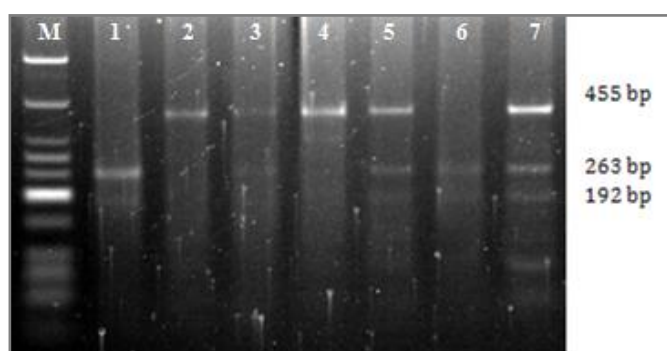
##### 4.1 Polimorfismo NOS2 (exão 16 – 14CT; intrão 16 - 88GT)

O polimorfismo exão/intrão16 do gene NOS2 foi analisado por PCR-RFLP em DNA genómico. O PCR foi realizado com a seguinte mistura reaccional: 10 pmol de *primers forward* e *reverse* de sequências 5'-TAAACCAACTTCCGTGGTGGG-3' e 5'-AGCTGGAGAATGGAGCTGGAC-3', respectivamente; 200µM de PCR *nucleotide Mix*, contendo quatro dNTPs; 25mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 U de *Taq* polymerase; e 200ng de DNA genómico, para um volume final de 50µl. As condições de PCR usadas foram *hot start* a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C (desnaturação), 45 segundos a 61°C (emparelhamento), 45 segundos a 72°C (extensão), acrescentando uma extensão de 5 minutos a 72°C.

O produto da reacção é de 455 pares de bases e foi digerido com a endonuclease Tas I (*Tsp509 I*) (Thermo Scientific®) a 65°C durante 16 horas para o exão 16 e Ade I (*Dra III*) 5U/µl (Thermo Scientific®) a 37°C durante 16 horas para o intrão 16. Os fragmentos hidrolisados foram submetidos a electroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) a 2% (m/v) em TAE (20mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH8,0), com 10µg/ml de brometo de etídeo, durante 90 min a 85V (Figura 5 e 6).



**Figura 5 - Perfil electroforético dos fragmentos do gene NOS2 (exão-16)** em gel de agarose. M – marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder 50 bp); 2 e 5 – fenótipo homozigótico sem mutação CC (285 bp + 170 bp); 1 e 3 fenótipo heterozigótico CT (285 bp + 170 bp + 137 bp + 33 bp); 4 - fenótipo homozigótico com mutação TT (285 bp + 137 bp).

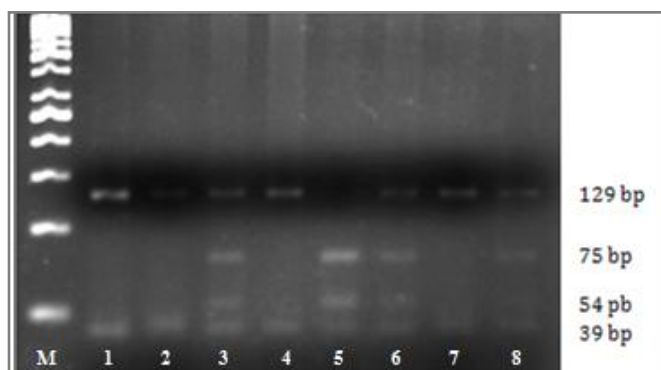


**Figura 6 - Perfil electroforético dos fragmentos do gene NOS2 (intrão-16)** em gel de agarose. M – marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder 50 bp); 2, 3 e 4 – fenótipo homozigótico sem mutação GG (455 bp); 5 e 7 – fenótipo heterozigótico GT (455 bp + 263 bp + 192 bp); 1 e 6 - fenótipo homozigótico com mutação TT (263 bp + 192 bp).

#### 4.2 Polimorfismo NOS2 (intrão 20 – IVS20 + 524 GA)

O polimorfismo intrão 20 do gene NOS2 foi analisado por PCR-RFLP em DNA genómico. O PCR foi realizado com a seguinte mistura reaccional: 10 pmol de *primers forward* e *reverse* de sequências 5'-TTATCCCAATCCCAGCCACTCG-3' e 5'-GCCAGGCTCTGTTTCTCTGATCC-3', respectivamente; 200µM de PCR *nucleotide Mix*, contendo quatro dNTPs; 25mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 U de *Taq* polymerase; e 200ng de DNA genómico, para um volume final de 50µl. As condições de PCR usadas foram *hot start* a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C (desnaturação), 45 segundos a 59°C (emparelhamento), 45 segundos a 72°C (extensão), acrescentando uma extensão de 5 minutos a 72°C.

O produto da reacção é de 168 pares de bases e foi digerido com endonuclease *Hinf* 5U/µl (Thermo Scientific®) a 37°C durante 16 horas. Os fragmentos hidrolisados foram submetidos a electroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) a 4% (m/v) em TAE (20mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH8,0), com 10µg/ml de brometo de etídio, durante 90 min a 85V (Figura 7).

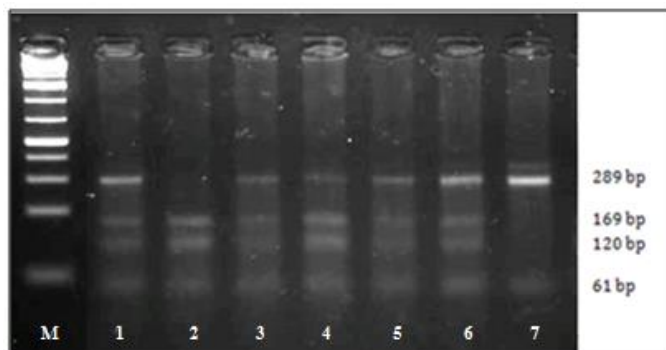


**Figura 7 - Perfil electroforético dos fragmentos do gene NOS2 (intrão 20) em gel de agarose.** M – marcador de peso molecular de DNA (DNA Ladder 50 bp); 5 – fenótipo homozigótico sem mutação GG (75 bp + 54 + 39 bp); 3, 6 e 8 – fenótipo heterozigótico GA (129 bp + 75 bp + 54 bp + 39 bp); 1, 2, 4 e 7 - fenótipo homozigótico com mutação AA (129 bp + 39 bp).

#### 4.3 Polimorfismo MPO (- 463 GA)

O polimorfismo MPO foi analisado por PCR-RFLP em DNA genómico. O PCR foi realizado com a seguinte mistura reaccional: 20 pmol de *primers forward* e *reverse* de sequências 5'-GTATAGGCACACAATGGTGAG-3' e 5'-GCAATGGTTCAAGCGATTCTTC-3', respectivamente; 200µM de PCR *nucleotide Mix*, contendo quatro dNTPs; 25mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 U de *Taq* polymerase; e 200ng de DNA genómico, para um volume final de 50µl. As condições de PCR usadas foram *hot start* a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 59°C (emparelhamento), 1 minuto a 72°C (extensão), acrescentando uma extensão de 7 minutos a 72°C.

O produto da reacção é de 350 pares de bases e foi digerido com endonuclease *Ssi I* (*Acil*) 5U/µl (Thermo Scientific®) a 37°C durante 16 horas. Os fragmentos hidrolisados foram submetidos a electroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) a 3% (m/v) em TAE (20mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH8,0), com 10µg/ml de brometo de etídio, durante 90 min a 85V (Figura8).



**Figura 8 - Perfil electroforético dos fragmentos do gene MPO em gel de agarose.** M – marcador de peso molecular de DNA (Gene Ruler 1 Kb-Thermo Scientific); 2 – fenótipo homozigótico sem mutação GG (169 bp + 120 + 61 bp); 1, 3, 4, 5 e 6 – fenótipo heterozigótico GA (289 bp + 169 bp + 120 bp + 61 bp); 7 - fenótipo homozigótico com mutação AA (289 bp + 61 bp).

## 5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA MPO

A determinação da concentração plasmática da MPO foi realizada utilizando o Kit “Human Myeloperoxidase Immunoassay” da “R&D Systems”.

Este método fundamentou-se na técnica de ELISA, um teste imunoenzimático baseado na interação anticorpo-antigénio. Neste ensaio utilizaram-se microplacas que são pré-revestidas por anticorpos monoclonais específicos para a MPO onde se adicionou o antigénio que se liga ao anticorpo. Posteriormente, adicionou-se um anticorpo policlonal marcado com uma enzima específica para a MPO. Depois realizou-se uma lavagem para a remoção de qualquer complexo anticorpo-enzima que não estivesse ligado.

Adicionou-se uma solução de substrato aos poços, tendo-se verificado o desenvolvimento de uma cor que é proporcional à quantidade de MPO ligada no passo inicial.

Finalmente, a intensidade da cor observada nos poços é medida no espectrofotómetro (Bio-Rad® PR2100 Reader) a um comprimento de onda de 450 nm.

## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi efectuada no software IBM SPSS Statistics 20 bem como no Primer of biostatistics, estabelecendo-se o nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

Para os parâmetros com variáveis contínuas, como é o caso da concentração plasmática da MPO, realizou-se teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* para as populações controlo e doentes, e procedeu-se a um teste não paramétrico *Mann-Whitney*, para avaliar as diferenças entre as populações controlo e doentes, entre os doentes com asma controlada e não controlada e entre doentes alérgicos e não alérgicos.

Para avaliar a relação entre os genótipos da MPO e a concentração da mesma enzima procedeu-se a uma análise não paramétrica *Kruskal-Wallis*.

No caso de dados discretos, como é o caso dos genótipos tanto dos controlos como dos doentes, foi utilizado o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson para avaliar se as populações se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Calculou-se, também, o *Odds Ratio* para determinar o risco relativo dos diferentes genótipos para a patologia em questão.

## RESULTADOS

Através de um estudo de associação caso/controlo, neste caso doentes asmáticos e dadores de sangue saudáveis, respectivamente, averiguou-se a possível existência de uma associação entre os polimorfismos estudados e a patologia em causa.

Os resultados obtidos derivaram dos 151 doentes que corresponderam aos critérios de selecção mencionados nos materiais e métodos e dos 213 dadores de sangue saudáveis que serviram como grupo controlo.

Dos 151 doentes asmáticos, foram genotipados eficazmente 151 para o polimorfismo intrão 20 + 524 G> A do gene NOS2, 150 para o polimorfismo G463A do gene MPO e 95 para os polimorfismos no exão 16 + 14C> T e intrão 16 + 88 G> T do gene NOS2. Relativamente ao grupo controlo, foram genotipados 213 indivíduos para o polimorfismo do gene MPO e 171 indivíduos para o intrão 20 do gene NOS2, com excepção dos dois últimos polimorfismos em que se obteve um número final inferior a 100 devido à quantidade insuficiente de amostra de DNA. Para a determinação da concentração da MPO utilizaram-se 45 doentes asmáticos e 34 dadores de sangue, todos do sexo masculino.

### 1. Análise Descritiva da População

A população total de estudo apresenta 365 indivíduos, dos quais 151 são doentes e 213 são controlos. Relativamente à característica género, existem 52 doentes asmáticos do sexo masculino e 99 do sexo feminino, enquanto 141 dadores de sangue são do sexo masculino e 72 do sexo feminino. Relativamente à característica idade, nos doentes a média de idade é de  $38.30 \pm 18.52$  e nos controlos é de  $41.56 \pm 11.73$  (Tabela 2).

Observa-se então que em relação à característica idade a média da população controlo e doente não varia muito, no entanto no que diz respeito a característica género é de notar que no grupo dos doentes tem uma maior percentagem de indivíduos do sexo feminino, ocorrendo o oposto no grupo controlo.

Dado este facto, comparámos separadamente as frequências genotípicas dos polimorfismos estudados entre homens e mulheres para cada uma das populações (doentes e controlos) aplicando o teste do *qui-quadrado* ( $\chi^2$ ) de Pearson. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos testes efectuados ( $p > 0.05$ ). Deste modo as diferenças encontradas na distribuição do género entre doentes e controlos não afectaram os resultados.

**Tabela 2** – Distribuição do sexo e idade nas populações em estudo.

Variável		Doentes	Controlos	Diferença estatística
Género	Masculino	52 (34%)	141 (66%)	$\chi^2 = 34.52$ , $p < 0.001$
	Feminino	99 (66%)	72 (34%)	
Idade		$38.30 \pm 18.52$	$41.56 \pm 11.73$	t test , $P = 0.041$

## 2. ANÁLISE DO POLIMORFISMO NOS2 (exão 16 + 14C> T)

No que diz respeito ao polimorfismo exão 16 + 14C> T, observa-se que no grupo controlo as frequências dos genótipos CC, CT e TT foram, respectivamente 31.9%, 5.2% e 0.5%. Foi efectuado um teste do *qui*-quadrado ( $\chi^2$ ) para testar se esta população se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que para este polimorfismo, as frequências genóticas encontram-se em equilíbrio ( $\chi^2 = 0.5$  e  $p = 0.4795$ ).

Na tabela 3 encontra-se a distribuição dos genótipos por controlo e doentes asmáticos. Relativamente a este polimorfismo a população de doentes asmáticos encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0.02$  e  $p = 0.8875$ ).

Realizou-se o teste do *qui* quadrado ( $\chi^2$ ) comparando as frequências genóticas dos dois grupos de populações (doentes asmáticos versus controlos) e observou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 9.284$  e  $p = 0.010$ ). As frequências alélicas são constituídas maioritariamente pelo alelo citosina em ambas as populações, sendo de 80.5% na população doente e 91.9% na população controlo. Existe diferença significativa entre as duas populações ( $\chi^2 = 8.409$  e  $p = 0.004$ ).

**Tabela 3** - Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo exão 16 + 14C> T no grupo de controlo e nos doentes asmáticos.

	Total	CC	CT	TT	p <sup>a</sup>	Alelo C	Alelo T	p <sup>b</sup>
	N	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
<b>Doentes</b>	100	65 (43.0%)	31 (20.5%)	4 (2.6%)	0.010	161 (80.5%)	39 (19.5%)	0.004
<b>Controlos</b>	80	68 (31.9%)	11 (5.2%)	1 (0.5%)		147 (91.9%)	13 (8.1%)	

<sup>a</sup> valor da significância do teste  $\chi^2$  para os genótipos; nível de significância de 0.05

<sup>b</sup> valor da significância do teste  $\chi^2$  para os alelos; nível de significância de 0.05

Por último, e uma vez que as frequências genótípicas do grupo de doentes asmáticos apresentaram uma diferença significativa em relação às do grupo controlo, foi efectuada uma análise do *Odds Ratio*, com o intuito de avaliar se algum dos genótipos exerce um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento desta doença. A associação sugere que o genótipo CT em conjunto com o homozigoto TT pode ser considerado um factor de risco para o desenvolvimento da asma (OR = 3.051; IC (95%) = [1.458 – 6.386]; p = 0.004) (Tabela 4).

**Tabela 4 - Odds Ratio** para a associação entre os genótipos do polimorfismo exão 16 + 14C> T.

Genótipos	Doentes (%)	Controlos (%)	OR	IC (95%)	P*
TT	4 (4%)	1 (1%)	3.292	0.361 – 30.050	0.510
CC	65 (65%)	68 (85%)	0.328	0.157 – 0.686	0.004
CT	31 (31%)	11 (14%)	2.818	1.312 – 6.053	0.011
<b>CT + TT</b>	<b>35 (35%)</b>	<b>12 (15%)</b>	<b>3.051</b>	<b>1.458 – 6.386</b>	<b>0.004</b>

\*significativo para p <0.05

### 3. ANÁLISE DO POLIMORFISMO NOS2 (intrão 16 + 88 G> T)

Em relação ao polimorfismo intrão 16 + 88G> T, na tabela 5 encontra-se a distribuição dos genótipos no grupo controlo e no grupo de doentes asmáticos. Para este polimorfismo foi efectuada um teste do *qui-quadrado* ( $\chi^2$ ) para testar se as populações se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que para este polimorfismo, as frequências genótípicas dos asmáticos se encontram em equilíbrio ( $\chi^2$ = 3.28 e p= 0.0701) enquanto as frequências genótípicas do grupo controlo não se encontram em equilíbrio ( $\chi^2$ = 5.73 e p= 0.0167).

Realizou-se o teste do *qui quadrado* ( $\chi^2$ ) comparando as frequências genótípicas dos dois grupos de populações (doentes asmáticos versus controlos) e não se observou uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2$ = 2.522 e p = 0.283). As frequências alélicas são constituídas maioritariamente pelo alelo guanina em ambas as populações, sendo de 63.2% na população doente e 71.3% na população controlo, não se tendo verificado uma diferença significativa entre as duas populações ( $\chi^2$ = 2.215 e p= 0.137).



**Tabela 5** - Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo intrão 16 + 88G> T no grupo de controlo e nos doentes asmáticos.

	Total	GG	GT	TT	p <sup>a</sup>	Alelo G	Alelo T	p <sup>b</sup>
	N	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
<b>Doentes</b>	95	42 (27.8%)	36 (23.8%)	17 (11.3%)	0.283	120 (63.2%)	70 (36.8%)	0.137
<b>Controlos</b>	80	45 (21.1%)	24 (11.3%)	11 (5.2%)		114 (71.3%)	46 (28.8%)	

<sup>a</sup> valor da significância do teste  $\chi^2$  para os genótipos; nível de significância de 0.05

<sup>b</sup> valor da significância do teste  $\chi^2$  para os alelos; nível de significância de 0.05

#### 4. ANÁLISE DO POLIMORFISMO NOS2 (intrão 20 + 524 G> A)

Quanto ao polimorfismo intrão 20 + 524 G> A, na tabela 6 encontra-se a distribuição dos genótipos por controlos e doentes com asma. Para este polimorfismo foi efectuado um teste do *qui*-quadrado ( $\chi^2$ ) para testar se as populações se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que para este polimorfismo, as frequências genótípicas dos asmáticos se encontram em equilíbrio ( $\chi^2= 3.83$  e  $p= 0.0503$ ), o mesmo não se verificando para o grupo controlo ( $\chi^2= 5.15$  e  $p= 0.0232$ ).

Relativamente às frequências alélicas, são constituídas maioritariamente pelo alelo adenina em ambas as populações, sendo de 57.6% na população doente e 70.2% na população controlo, tendo-se observado uma diferença significativa entre as duas populações ( $\chi^2= 10.479$  e  $p= 0.001$ ).

**Tabela 6** – Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo intrão 20 + 524 G> A no grupo de controlo e nos doentes asmáticos.

	Total	GG	GA	AA	p <sup>a</sup>	Alelo G	Alelo A	p <sup>b</sup>
	N	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
<b>Doentes</b>	151	33 (21.9%)	62 (41.1%)	56 (37.1%)	<0.001	128 (42.4%)	174 (57.6%)	0.001
<b>Controlos</b>	171	9 (4.2%)	84 (39.4%)	78 (36.6%)		102 (29.8%)	240 (70.2%)	

<sup>a</sup> valor da significância do teste  $\chi^2$  para os genótipos; nível de significância de 0.05

<sup>b</sup> valor da significância do teste  $\chi^2$  para os alelos; nível de significância de 0.05

Realizou-se ainda o teste do *qui* quadrado ( $\chi^2$ ) comparando as frequências genótípicas dos dois grupos de populações (doentes asmáticos versus controlos), tendo-se verificado uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2= 19.474$  e  $p < 0.001$ ).

Por último, e uma vez que as frequências genotípicas apresentaram uma diferença significativa, foi efectuada uma análise do *Odds Ratio*, com o intuito de avaliar se algum dos genótipos exerce um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento desta doença. A associação sugere que o genótipo GG pode ser considerado um factor de risco para o desenvolvimento da asma (OR = 5.034; IC (95%) = [2.321 – 10.919];  $p < 0.001$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7** - *Odds Ratio* para a associação entre os genótipos do polimorfismo intrão20 + 524 G> A.

Genótipos	Doentes (%)	Controlos (%)	OR	IC (95%)	P*
AA	56 (37%)	78 (46%)	0.703	0.450 – 1.099	0.151
GG	33 (22%)	9 (5%)	<b>5.034</b>	<b>2.321 – 10.919</b>	<b>&lt;0.001</b>
GA	62 (41%)	84 (49%)	0.722	0.464 – 1.122	0.181

\*significativo para  $p < 0.05$

## 5. ANÁLISE DO POLIMORFISMO MPO (G463A)

No que concerne ao polimorfismo MPO G463A, na tabela 8 encontra-se a distribuição dos genótipos por controlo e doentes com asma. Para este polimorfismo foi efectuado o teste do *qui-quadrado* ( $\chi^2$ ) para testar se as populações se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tendo sido observado que para este polimorfismo, as frequências genotípicas dos asmáticos não se encontram em equilíbrio ( $\chi^2 = 6.021$  e  $p = 0.0142$ ), ao contrário do grupo controlo ( $\chi^2 = 1.72$  e  $p = 0.1896$ ).

Realizou-se o teste do *qui quadrado* ( $\chi^2$ ) comparando as frequências genotípicas dos dois grupos de populações (doentes asmáticos versus controlos) e observou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 40.429$  e  $p < 0.001$ ). Existiu ainda uma diferença significativa ( $\chi^2 = 33.812$ ,  $p < 0.001$ ), entre as frequências alélicas das duas populações, com um aumento da frequência do alelo Adenina nos doentes asmáticos.

**Tabela 8** - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo MPO G463A no grupo de controlo e nos doentes asmáticos.

	Total	GG	GA	AA	p <sup>a</sup>	Alelo G	Alelo A	p <sup>b</sup>
	N	N (%)	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	
<b>Doentes</b>	150	29 (19.2%)	90 (59.6%)	31 (20.5%)	<0.001	148 (49.3%)	152 (50.7%)	<0.001
<b>Controlos</b>	213	111 (52.1%)	80 (37.6%)	22 (10.3%)		302 (70.9%)	124 (29.1%)	

<sup>a</sup> valor da significância do teste  $\chi^2$  para os genótipos; nível de significância de 0.05

<sup>b</sup> valor da significância do teste  $\chi^2$  para os alelos; nível de significância de 0.05

Por último, e uma vez que as frequências genótípicas do grupo de doentes asmáticos apresentaram uma diferença significativa comparativamente às do grupo controlo, foi efectuada uma análise do *Odds Ratio*, com o intuito de avaliar se algum dos genótipos exerce um efeito protector ou de risco para o desenvolvimento desta doença. A associação sugere que o genótipo GA em conjunto com o homozigoto AA pode ser considerado um factor de risco para o desenvolvimento da asma (OR = 4.541; IC (95%) = [2.792 – 7.384];  $p < 0.001$ ) (Tabela 9).

**Tabela 9** - *Odds Ratio* para a associação entre os genótipos do polimorfismo MPO G463A.

Genótipos	Doentes (%)	Controlos (%)	OR	IC (95%)	P*
AA	31 (21%)	22 (16%)	2.262	1.251 – 4.090	0.009
GG	29 (19%)	111 (52%)	0.220	0.135 – 0.358	<0.001
GA	90 (60%)	80 (38%)	2.494	1.625 – 3.828	<0.001
<b>GA + AA</b>	<b>121 (81%)</b>	<b>102 (48%)</b>	<b>4.541</b>	<b>2.792 – 7.384</b>	<b>&lt;0.001</b>

\*significativo para  $p < 0.05$

## 6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DA MPO

Inicialmente, estudou-se a normalidade da variável concentração da MPO para a população de doentes asmáticos e o grupo controlo. Observou-se então que ambas as populações não apresentavam uma distribuição normal ( $p=0,003$  e  $p=0.000$ , respectivamente). Desta forma efectou-se uma análise descritiva de modo a saber a média da concentração da MPO para as populações dos doentes e controlos. Observou-se que a população de doentes com asma tem como média  $26.511 \pm 23.115$  ng/mL e a população controlo  $23.285 \pm 33.377$  ng/mL.

Para fazer a comparação da concentração da MPO entre as populações doentes e controlos, e perceber se existem diferenças estatisticamente significativas entre estas, efectuou-se um teste não paramétrico *Mann-Whitney* para a variável não normal. Os resultados obtidos demonstram diferenças estatisticamente significativas na concentração de MPO entre os doentes e o grupo controlo ( $p=0.004$ ), nos quais os doentes apresentam valores mais elevados de MPO (Tabela 10 e Figura suplementar 4 – Anexo I).

**Tabela 10-** Concentração da MPO para a população de doentes asmáticos e o grupo controle.

Concentração da MPO (ng/mL)					
	N	Mediana	Máximo	Mínimo	P*
<b>Doentes</b>	45	19.300	129.4	7.1	0.004
<b>Controlos</b>	34	13.000	152.6	3.1	

\*Nível de significância do teste *Mann-Whitney* de 0.05

Realizou-se um teste de associação entre os genótipos e a concentração da MPO, nas duas populações. Os resultados obtidos indicam a existência de associação estatisticamente significativa na distribuição dos valores da concentração de MPO pelos genótipos na população de doentes asmáticos ( $p=0.009$ ), os doentes com o genótipo GG apresentam valores de concentração da MPO mais elevados enquanto a população controlo não apresenta uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0.172$ ) (Tabela 11 e Figura suplementar 5 e 6 – Anexo I).

**Tabela 11-** Associação entre os genótipos da MPO e a concentração enzimática nas duas populações.

Concentração da MPO (ng/mL)						
	Genótipos	N	Mediana	Máximo	Mínimo	P*
<b>Doentes</b>	<b>GG</b>	9	40.300	129.4	15.4	0.009
	<b>GA</b>	25	16.500	79.0	7.9	
	<b>AA</b>	11	18.600	54.4	7.1	
<b>Controlos</b>	<b>GG</b>	18	16.550	152.6	3.4	0.172
	<b>GA</b>	13	11.500	24.9	3.1	
	<b>AA</b>	3	9.200	18.6	6.3	

\*Nível de significância do teste *Krusk al-wallis* de 0.05

Por último, estudou-se ainda a existência de diferenças na concentração da MPO entre os doentes alérgicos e não alérgicos e os doentes controlados e os não controlados. Os resultados obtidos não indicam diferenças estatisticamente significativas na concentração da MPO entre doentes asmáticos controlados e não controlados ( $p=0.293$ ) e nem entre doentes alérgicos e não alérgicos ( $p=0.054$ ) (Tabela 12).

**Tabela 12-** Relação da concentração da MPO com os níveis de controlo de asma e o tipo de asma.

	Concentração da MPO (ng/mL)				P*
	N	Mediana	Máximo	Mínimo	
<b>Controlados</b>	32	18.750	79.0	7.1	0.293
<b>Não Controlados</b>	13	23.500	129.4	7.9	
<b>Alergia</b>	43	19.000	129.4	7.1	0.054
<b>Sem alergia</b>	2	55.200	79.0	31.4	

\*Nível de significância do teste *Mann-Whitney* de 0.05

## 7. INTERACÇÃO EPISTÁTICA ENTRE O POLIMORFISMO MPO G463A E EXÃO 16 + 14C> T DA NOS2

Efectuou-se uma análise comparativa entre os genótipos dos polimorfismos MPO e exão 16, onde se realizou o teste do *qui* quadrado ( $\chi^2$ ) comparando as frequências genótípicas dos polimorfismos MPO G463A e Exão 16 do gene NOS2 nos dois grupos de populações (doentes asmáticos e grupo controlo), tendo-se verificado uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2= 20.284$  e  $p < 0,001$ ).

Uma vez que as frequências genótípicas apresentaram uma diferença estatisticamente significativa, foi efectuada uma análise do *Odds Ratio*, com o intuito de avaliar se estes dois genótipos quando relacionados, aumentam ou não o factor de risco. A associação sugere que a presença destes dois genótipos GA ou AA do polimorfismo MPO e CT ou TT do polimorfismo exão 16 + 14C> T num indivíduo aumenta significativamente o factor de risco quando comparados individualmente (OR = 11.250; IC (95%) = [3.820 – 33.132];  $p < 0.001$ ) (Tabela 13).

**Tabela 13** – Associação entre o polimorfismo MPO G463A e Exão 16 + 14C> T da NOS2

Genótipos	Doentes (%)	Controlos (%)	OR	IC (95%)	P
<b>MPO (GA + AA) + Exão 16 (CT + TT)</b>	27 (65.85%)	6 (14.63%)	<b>11.250</b>	<b>3.820 – 33.132</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>MPO (GG) + Exão 16 (CC)</b>	14 (34.15%)	35 (85.37%)			

## 8. INTERACÇÃO EPISTÁTICA ENTRE O POLIMORFISMO MPO G463A E INTRÃO 20 + 524 G> A DA NOS2

Efectuou-se uma análise comparativa entre os genótipos dos polimorfismos MPO e intrão 20, onde se realizou o teste do *qui* quadrado ( $\chi^2$ ) comparando as frequências genótípicas dos dois polimorfismos MPO G463A e Intrão 20 do gene NOS2 nos dois grupos de populações (doentes asmáticos e grupo controlo), tendo-se observado uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2= 39.841$  e  $p < 0,001$ ).

Uma vez que as frequências genótípicas apresentaram uma diferença estatisticamente significativa, foi efectuada uma análise do *Odds Ratio*, com o intuito de avaliar se estes dois genótipos quando relacionados aumentam ou não o factor de risco. A associação sugere que a presença destes dois genótipos GA ou AA do polimorfismo MPO e GG do polimorfismo intrão 20 + 524 G> A num indivíduo aumenta cerca de cinco vezes o factor de risco quando comparados individualmente (OR = 24.107; IC (95%) = [7.561 – 76.861];  $p < 0.001$ ) (Tabela 14).

**Tabela 14** – Associação entre o polimorfismo MPO G463A e Intrão 20 + 524 G> A da NOS2

Genótipos	Doentes (%)	Controlos (%)	OR	IC (95%)	P
<b>MPO (GA + AA) + Intrão20 (GG)</b>	25 (54.35%)	4 (4.71%)	<b>24.107</b>	<b>7.561 – 76.861</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>MPO (GG) + Intrão20 (GA + AA)</b>	21 (45.65%)	81 (95.29%)			

Realizou-se ainda uma análise comparativa entre os genótipos dos polimorfismos MPO, exão16 e intrão 20, onde se efectuou o teste do *qui* quadrado ( $\chi^2$ ) comparando as frequências genótípicas entre os polimorfismos nos dois grupos de populações (doentes asmáticos e grupo controlo), tendo-se obtido uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2= 10.601$  e  $p = 0.001$ ). Pelo facto de ter havido um resultado nulo não foi possível realizar a análise do *Odds Ratio*.

A interacção epistática dos polimorfismos Exão 16 e o Intrão 20 do gene NOS2 também foi analisada através do teste do *qui* quadrado ( $\chi^2$ ) onde se verificou uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2= 6.829$  e  $p = 0.009$ ). A existência de um resultado nulo não possibilitou a realização da análise do *Odds Ratio*.

## **9. RELAÇÃO DOS POLIMORFISMOS COM O TIPO DE ALERGIA E TIPO DE ASMA**

Todos os doentes incluídos neste estudo foram medicados de acordo com a sua situação clínica e mais tarde analisou-se a evolução da sua condição através do inquérito ACQ. Dos 151 asmáticos, 107 (70.9%) tinham a doença controlada e 44 (29.1%) foram classificados como não controlados.

Para além do estudo dos genes acima mencionados, estudou-se ainda a existência de diferenças entre doentes alérgicos (84.4%) e não alérgicos (15.2%) entre os doentes controlados e os não controlados, nos diferentes polimorfismos em estudo.

Os polimorfismos intrão 20 + 524 G> A do gene NOS2, G463A do gene MPO e o polimorfismo exão 16 + 14C> T e intrão 16 + 88 G> T do gene NOS2 foram comparados entre os doentes controlados e não controlados, onde não se observaram diferenças estatisticamente significativas. Quanto a estes polimorfismos, quando relacionados com o tipo de asma (alérgica e não alérgica), também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela suplementar 1- Anexo II).

## **DISCUSSÃO**

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas que se caracteriza por dificuldades recorrentes de respiração (National Heart, Lung and Blood Institute 2007). Esta doença complexa é sobretudo desencadeada pela interacção de múltiplos genes e os factores ambientais. Contudo, não são só os factores ambientais a causa para a doença, os factores genéticos contribuem cerca de 40 a 60% do risco para o desenvolvimento da asma (Meng & Rosenwasser, 2010). Devido ao facto da asma ter uma prevalência elevada, é compreensível o interesse em tentar perceber os mecanismos moleculares e genéticos possivelmente responsáveis pela etiopatogenia desta doença.

A Sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) é expressa no epitélio das vias aéreas em resposta a citocinas pró-inflamatórias e está envolvida na formação do óxido nítrico, catalizando a reacção da L-arginina a L-citrulina. O óxido nítrico tem múltiplas ações e um aumento da produção deste gás nos doentes asmáticos é bem evidenciado pelo aumento dos níveis de NO no ar exalado dos asmáticos. O NO apresenta efeitos benéficos nas vias aéreas como broncodilatador e efeitos prejudiciais como vasodilatador, aumentando a exsudação plasmática e como amplificador da resposta inflamatória (Barnes, P.J., 1996).

Sabe-se que o polimorfismo exão 16 provoca uma alteração não sinónima com substituição do aminoácido serina por leucina. No entanto, o papel do alelo T ainda não foi clarificado. Jorge *et al.*, 2010 afirma que está associado a uma actividade aumentada da iNOS, havendo assim uma maior produção de NO.

Existem alguns estudos no sentido de caracterizar e relacionar este polimorfismo com outras patologias, no entanto a associação deste com a asma ainda não é conhecida (Li *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2010; Jorge *et al.*, 2010).

Um dos objectivos deste estudo foi determinar se o polimorfismo exão 16 do gene NOS2 está associado à susceptibilidade de desenvolver asma. Para este polimorfismo obteve-se uma diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos ( $p = 0.010$ ) e a análise de risco demonstrou um risco associado ao genótipo CT e TT (OR = 3.051), e que o genótipo CC actua como um factor protector (OR= 0.328). Os genótipos CT e TT provocam um aumento da produção do NO, e os efeitos deletérios que isso provoca aumentam a formação de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um agente altamente reactivo que poderá promover a inflamação e hiper-reactividade das vias respiratórias através do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (Dekkers *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2010). Por outro lado, o genótipo homozigótico CC baixa a produção do óxido nítrico, permitindo um relaxamento do músculo liso protegendo contra a hiper-reactividade das vias aéreas (Maarsingh *et al.*, 2003). Assim, podemos sugerir que o estudo demonstra uma relação entre o polimorfismo e o desenvolvimento da asma.

No que diz respeito ao polimorfismo intrão 16, os resultados demonstram que não existem diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos e alelos entre a população de asmáticos e o grupo de controlo ( $p > 0.05$ ). Desta forma o estudo não demonstra uma relação entre o polimorfismo intrão 16 e a asma, podendo isto dever-se ao facto da população em estudo ter apenas 95 indivíduos genotipados, um número inferior ao N ideal (N = 658), calculado através do Primer of biostatistics. Estes resultados podem ser confirmados aumentando o tamanho da amostra.

Relativamente ao polimorfismo intrão 20, mais especificamente a variante A, foi associada ao aumento da actividade da NOS2, gerando um nível elevado de NO. O objectivo deste estudo foi determinar se existe uma associação entre este polimorfismo e o desenvolvimento da asma. Obteve-se uma diferença estatisticamente significativa na distribuição do genótipo ( $p < 0.001$ ) e a análise de risco demonstrou um risco associado ao genótipo GG (OR = 5.034) que estaria associado a uma menor expressão do enzima.



Ainda não é conhecida uma associação deste polimorfismo com a asma, não sendo possível comparar estes resultados com os de outros estudos. Mas, apesar de não se conhecer ainda uma acção clara deste SNP, presume-se que afecte o *splicing*/expressão do gene ou aumente a actividade da NOS2 e síntese de NO (Jorge *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2009).

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima importante na regulação do stresse oxidante através da produção de HOCl e de outros ROS, que participam na “explosão” oxidativa durante a resposta imune inata (Kämpe *et al.*, 2011; Polonikov *et al.*, 2009). Sabe-se que o polimorfismo MPO G463A, e mais concretamente o alelo A, foi associado a uma diminuição da ligação SP1 e portanto uma menor actividade transcripcional do gene e da produção de ROS.

O objectivo deste estudo relativamente ao polimorfismo G463A da MPO foi determinar se existe uma associação entre este e o desenvolvimento da asma. Obteve-se uma diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos ( $p < 0.001$ ) e a análise de risco demonstrou um risco associado aos genótipos GA e AA (OR = 4.541). O genótipo homozigótico GG por outro lado, actua como um factor protector (OR= 0.220). Neste caso, os indivíduos portadores do genótipo GA ou AA revelaram uma diminuição da expressão de MPO, que por sua vez promoveu o aumento da inflamação respiratória que pode ter-se devido a uma acumulação de peróxido de hidrogénio e outros oxidantes que dependem dele para a sua formação (Wenten *et al.*, 2009).

Por outro lado, o genótipo GG revela um aumento da expressão de MPO, gerando um nível elevado de ácido hipocloroso que em condições fisiológicas funciona como um agente anti microbica contra uma vasta gama de microrganismos, sendo essencial na vigilância imunitária e nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Abu-Soud H.M. & Hazen S.L., 2000; Polonikov *et al.*, 2009). Este fenómeno torna o genótipo GG um factor protector contra o desenvolvimento da asma, demonstrando uma relação entre o polimorfismo e o desenvolvimento desta patologia.

Para avaliar se os níveis séricos da MPO estariam relacionados com a patologia em questão, compararam-se estes níveis séricos entre os doentes e controlos. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa da concentração da MPO nas duas populações ( $p=0.004$ ), em que os doentes apresentaram valores mais elevados do enzima quando comparado com o grupo controlo. Este aumento da concentração plasmática da MPO na população de doentes asmáticos demonstra que esta enzima actua no combate a agentes patogénicos através da activação e libertação do enzima nos locais de inflamação, durante a fagocitose.

Sabe-se que o polimorfismo MPO G463A pode alterar a transcrição e/ ou a tradução do gene da MPO, uma vez que este polimorfismo está localizado a montante do codão de iniciação da tradução, que pode modificar a eficiência da tradução (Chu *et al.*, 2010). Através do estudo dos genótipos da MPO e a concentração da mesma verificou-se que o genótipo GG apresenta valores de concentração mais elevados comparativamente ao genótipo homozigótico com mutação. Este resultado permite demonstrar que o genótipo GG está associado a um aumento da expressão e actividade da MPO.

Uma vez que a iNOS e a MPO estão ligadas, pôde-se estudar a interacção epistática entre as variantes polimórficas para observar se os resultados obtidos em isolado se observam em conjunto. Assim, observou-se que o genótipo GA ou AA da MPO associado ao CT ou TT do polimorfismo exão 16 (OR= 11.250) revelou-se um grande factor de risco, assim como o genótipo GA ou AA da MPO associado ao homozigótico (GG) do intrão 20 (OR= 24.107).

Sabe-se que a mieloperoxidase na presença de peróxido de hidrogénio utiliza o óxido nítrico, produzido pela iNOS para gerar espécies reactivas de nitrogénio durante a inflamação, reduzindo a sua biodisponibilidade nas vias respiratórias. A diminuição da biodisponibilidade de NO pode contribuir para a diminuição da defesa anti microbiana do hospedeiro e presumivelmente diminui os níveis broncodilatadores. No caso da interacção epistática entre o genótipo GG ou AA da MPO associado ao CT ou TT do polimorfismo exão 16 da iNOS, podemos observar que existe um aumento da concentração da actividade do NO que poderá reagir com o superóxido em vez da MPO formando o peroxinitrito que promove a broncoconstrição (Abu-Soud H.M. & Hazen S.L., 2000; Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2006).

Outro dos factores que poderá explicar este aumento do factor de risco é uma fraca libertação da MPO pelos leucócitos e um aumento do consumo de NO nas células fagocíticas e consequentemente uma diminuição da concentração da MPO circulante e uma redução da biodisponibilidade de NO nas reacções inflamatórias que conduzem a acções pro-inflamatórias nas vias respiratórias (Lau *et al.*, 2006; Baldus *et al.*, 2004; Baldus *et al.*, 2006).

Relativamente à interacção epistática entre o genótipo GG ou AA da MPO associado ao genótipo GG do intrão 20, observa-se uma diminuição da actividade da mieloperoxidase e da sintase do óxido nítrico induzível que conduz ao aumento expressivo para a susceptibilidade de desenvolver asma.

Ainda não é conhecida uma associação do polimorfismo intrão 20 da NOS2 com a asma, não sendo possível explicar estes resultados com os de outros estudos.

## CONCLUSÃO

O principal objectivo deste trabalho incidiu no estudo da contribuição dos polimorfismos genéticos relativos a biodisponibilidade do óxido nítrico, da sintase do óxido nítrico induzível, da mieloperoxidase e do biomarcador circulante MPO no desenvolvimento da asma.

Neste estudo observámos que o genótipo CT e TT do polimorfismo exão 16 da iNOS e o genótipo GG do polimorfismo intrão 20 da iNOS estão associados a uma maior susceptibilidade de desenvolver asma.

No caso do polimorfismo intrão 16 da iNOS os resultados demonstram que não existe diferença estatisticamente significativa em relação aos controlos. As possíveis conclusões a serem retiradas terão de ser confirmadas aumentando a amostragem de modo a melhorar o poder da amostra e, consequentemente obter dados mais representativos.

Em relação ao polimorfismo MPO G463A verificou-se que o genótipo GA e AA estão associados a uma maior susceptibilidade de desenvolver asma. O estudo do polimorfismo genético da MPO com a concentração enzimática entre a população de doentes asmáticos e controlos apresenta uma diferença estatisticamente significativa, o que significa que estes podem servir como um biomarcador de susceptibilidade à doença. Através deste estudo verificou-se também que o genótipo GG está associado ao aumento da expressão e concentração da MPO.

A interacção epistática entre os polimorfismos destas duas enzimas, onde GA e AA da MPO associado ao CT ou TT do polimorfismo exão 16 apresentam um grande factor de risco, assim como o genótipo GA ou AA da MPO associado ao homozigótico (GG) do intrão 20, quando comparados individualmente. Isto sugere que a presença conjunta do polimorfismo destas duas enzimas aumenta consideravelmente a susceptibilidade de desenvolver asma.

No entanto, são necessários estudos mais abrangentes envolvendo mais enzimas da via de síntese do NO, como a arginase, bem como o estudo dos níveis circulantes do óxido nítrico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Soud, H.M. & Hazen, S.L., 2000. Nitric Oxide Modulates the Catalytic Activity of Myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(8), pp. 5425-5430.
- Alderton, W. K., Cooper, C.E. & Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357, pp. 593-615.
- Baldus, S., Heitzer, T., Eiserich, J.P., Lau, D., Mollnau, H., Ortak, M., Petri, S., Goldmann, B., D H., Berger, J., Helmchen, U., Freeman, B. A., Meinertz, T., Münzel, T., 2004. Myeloperoxidase Enhances Nitric Oxide Catabolism During Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(6), pp.902-911.
- Baldus, S., Rudolph, V., Roiss, M., Wulf, D., Rudolph, T. K., Eiserich, J. P., Sydow, K., Lau, D., Szöcs, K., Klinke, A., Kubala, L., Berglund, L., Schrepfer, S., Deuse, T., Haddad, M., Risius, T., Klemm, H., Reichenspurner, H. C., Meinertz, T., Heitzer, T., 2006. Heparins Increase Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Liberating Vessel-Immobilized Myeloperoxidase. *Journal of the American Heart Association*, 113, pp. 1871-1878.
- Barnes, P.J., 1996. NO or no NO in asthma? *Thorax*, 51, pp.218–221.
- Benson, Renée C., Hardy, Karen A. & Morris, Claudia R., 2011. Arginase and Arginine Dysregulation in Asthma. *Journal of Allergy*, pp 1-12.
- Billiar, T. R. & Morris, S.M., 1994. New insights into the regulation of inducible nitric synthesis. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 266, pp. 829-839.
- Bloemen, K., Verstraelen, S., Heuvel, R. V. D., Witters, H., Nelissen, I., Schoeters, G., 2007. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology Letters*, pp. 6-18.
- Bonavida, B., Khineche, S., Huerta-Yepez, S., Garbán H., 2006. Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. *Drug Resistance Updates*, 9, pp.157-173.
- Bugalho de Almeida, A., 2010. Relatório Síntese das Actividades do ano de 2010 da Comissão de Coordenação do Programa Nacional de Controlo da Asma.
- Busse, William W. & Lemanske, Robert F., 2003. Asthma: Allergic disorders. *Journal Allergy Clinical Immunology*, pp. 502-519.
- Chu, H., Wang, M., Wang, M., Gu, D., Wu, D., Zhang, Z., Tang J., Zhang, Z., 2010. The MPO -463 G>A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 43 case-control studies. *Mutagenesis*, 25(4), pp.389-395.

- Clark, Margaret Varnell, 2011. *Asthma: A clinicians`s Guide*.
- Cookson, W., 2004. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nature reviews. Immunology*, 4(12), pp.978–88.
- Dekkers, B. G. J., Maarsingh, H., Meurs, H., Gosens, R., 2009. Airway Structural Components Drive Airway Smooth Muscle Remodeling in Asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6, pp.683-692.
- Dupuy, P.M., Shore, S. A., Drazen, J. M., Frostell, C., Hill, W. A., Zapol, W. M., 1992. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *The Journal of clinical investigation*, 90(2), pp.421–8.
- Dusse, L. M. S., Vieira, L. M., Carvalho, M. G., 2003. Revisão sobre óxido nítrico, 39(4), pp. 343-350.
- Feyler, A., Voho, A., Boucharardy, C., Kuokkanen, K., Dayer P., Hirvonen, A., Benhamou, S., 2002. Point: Myeloperoxidase -463G>A Polymorphism and Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11, pp.1550-1554.
- Ghosh, S. & Erzurum, S.C., 2011. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810, pp. 1008-1016.
- Heltianu, C., Guja, C., Manea, Simona-Adriana, 2011. *Genetic Determinants of Microvascular Complications in type1 Diabetes*, pp. 3-28.
- Holgate, Stephen T., 2008. Pathogenesis of Asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 38, pp. 872-897.
- Ignarro, L.J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and release from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, pp.9265–9269.
- Islam, T., Breton, C., Salam, M. T., CcConnell, R., Wenten, M., Gauderman, W. J., Conti, D., Berg, D. V. D., Peters, J. M., Gilliland, F. D., 2010. Role of inducible nitric oxide synthase in asthma risk and lung function growth during adolescence. *Thorax*, 65, pp. 139-145.
- Jorge, Yvana C., Duarte, Maria C. & Silva, Ana E., 2010. Gastric cancer is associated with NOS2 -954 G/C polymorphism and environmental factors in a Brazilian population. *BMC Gastroenterology*, 10(64), pp.1-8.
- Juniper, E.F., O'Byrne, Guyatt, Ferrie, King D. R., 1999. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. *Eur Respir J*, 14, pp.902-907.

- Kämpe, M., Stolt, I., Lampinen, M., Jason, C., Stålenheim, G., Carlson, M., 2011. Patients with allergic rhinitis and allergic asthma share the same pattern of eosinophil and neutrophil degranulation after allergen challenge. *Clinical and Molecular Allergy*, 9(3), pp. 1-10.
- Knowles, R.G. & Moncada, S., 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, 298, pp. 249-258.
- Lau, D. & Baldus, S., 2006. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 111, pp. 16-26.
- Lee, Kyoung-Mu, Kang, D., Park, S. K., Berndt, S. I., Reding, D., Chatterjee, N., Chanock, S., Huang, Wen-Yi, Hayes, R. B., 2009. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 30(4), pp.621-625.
- Li, C., Hu, Z., Liu, Z., Wang, Li-E, Gershenwald, J. E., Lee, J. E., Prieto, V. G., Duvic, M., Grimm, E. A., Wei, Q., 2007. Polymorphisms of the Neuronal and Inducible Nitric Oxide Synthase Gene and the Risk of Cutaneous Melanoma. *American Cancer Society*, 109(8), pp.1570-1578.
- Li, Y., Qin, Y., Wang, Mei-Lin, Zhu, Huan-Feng, Huang, Xin-En, 2011. The Myeloperoxidase -463G>A Polymorphism Influences Risk of Colorectal Cancer in Southern China: a case-control study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12, pp. 1789-1793.
- Maarsingh, H., Zaagsma, J., Meurs, H., 2009. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspective. *British Journal of Pharmacology*, 158, pp. 652-664.
- Maarsingh, H. Meurs, H. & Zaagsma, J., 2003. Arginase and asthma: novel insights in nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends in Pharmacological sciences*, 24, pp. 450-455.
- Marchand, L. L., Seifried, A., Lum, A., Wilkens, L. R., 2000. Association of the Myeloperoxidase <sup>-463</sup>G>A Polymorphism with Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9, pp. 181-184.
- Martín, M. C., Martinez, A., Mendoza, J. L., Taxonera, C., Díaz-Rubio, M., Fernández-Arquero, M., Concha, E. G., Urcelay, E., 2007. Influence of the inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) on inflammatory bowel disease susceptibility. *Immunogenetics*, 59, pp. 833-837.
- Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley R., 2004. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy*, (59), pp.469–478.

- Meng, Jian-Feng & Rosenwasser, L. J., 2010 Untraveling the Genetics Basis of Asthma and Allergic Diseases. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 2(4) pp. 215-227.
- Moncada, S. & Higgs, A., 1993. The L-Arginine - Nitric Oxide Pathway. *The new England Journal of Medicine*, 329(27), pp. 2002-2012.
- Mori, Masataka, 2007. Regulation of Nitric Oxide Synthesis and Apoptosis by Arginase and Arginine Recycling. *The Journal of Nutrition*, pp.1616-1620.
- National Heart, Lung and Blood Institute, 2007. *Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma Full Report 2007*.
- Nevin, B.J. & Broadley, K.J., 2002. Nitric oxide in respiratory diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, (95), pp.259-293.
- Pelaia, G., Vatrella, A. & Maselli, R., 2012. The potencial of biologics for the treatment of asthma. *Nature Reviews Drug Discovery* (11), pp. 958-972.
- Podrez, E. A., Abu-soud, H. M. & Hazen, S. L., 2000. Myeloperoxidase - Generated Oxidants and Atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(12), pp.1717-1725.
- Polonikov, A.V., Soodilova, M. A. & Ivanov, V. P., 2009. Genetic Variation of Myeloperoxidase Gene Contributes to Atopic Asthma Susceptibility: A Preliminary Association Study in Russian Population. *Journal of Asthma*, 46, pp.523-528.
- Qudwai, T. & Jamal, F., 2010. Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Gene Polymorphism and Disease Prevalence. *Scandinavian Journal of Immunology*, 72, pp. 375-387.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. & Moncada, S., 1987. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2(8567), pp.1057-8.
- Salam, M. T., Bastain, T. M., Rappaport, E. B., Isla, T., Berhane, K., Gauderman, W. J., Gilliland, F. D., 2011. Genetic Variations in Nitric Oxide Synthase and Arginase Influence Exhaled Nitric Oxide Levels in Children. *Allergy*, 66(3) pp. 412-419.
- Silkoff, P. E., Lent, A. M., Busacker, A. A., Katial, R. K., Balzar, S., Strand, M., Wenzel, S. E., 2005. Exhaled nitric oxide identifies the persistent eosinophilics phenotype in severe refractory Asthma. *Journal of Clinical Immunology*, pp. 1249-55.
- Singh, V., Mehrotra, S., Narayan, P., Pandey, C. M., Agarwal, S. S., 2000. Modulation of Autoimmune Diseases by Nitric Oxide. *Immunologic Research*, 22, pp.1-19.
- Velez, D. R., Hulme, W. F., Myers, J. L., Weinberg, J. B., Levesque, M. C., Steykowski, M. E., Abbate, E., Estevan, R., Patillo, S. G., Gilbert, J. R., Hamilton, C. D., Scott, W. K., 2009. NOS2A, TLR4, and IFNGR1 interactions influence pulmonary tuberculosis susceptibility in African-Americans. *Human Genetics*, 126(5) pp.643-653.

- Wang, S. S., Davis, S., Cerhan, J. R., Hartge, P., Severson, R. K., Cozen, W., Lan, Q., Welch, R., Chanock, S. J., Rothman, N., 2006. Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*, 27 (9), pp.1828-1834.
- Wenten, M., Gauderman, W. J., Berhane, K., Lin, Pi-Chu, Peters, J., Gilliland, F. D., 2009. Functional Variants in the Catalase and Myeloperoxidase Genes, Ambient Air Pollution, and Respiratory-related School Absences: An Example of Epistasis in Gene-Environment Interactions. *American Journal of Epidemiology*, 170(12), pp.1494-1501.
- WHO, 2007. *Vigilância global, prevenção e controlo das doenças respiratórias crónicas: Uma abordagem integradora*.
- Xu, W., Charles, I. G., Liu, L., Moncada, S., Emson, P., 1996. Molecular Cloning and Structural Organization of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene (NOS2). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 219, pp. 784-788.
- Yoo, K. H., Kim, S. K., Chung, Joo-Ho, Chang, Sung-Goo, 2010. Nitric oxide synthase2 gene polymorphisms are associated with prostatic volume in Korean men with benign prostatic hyperplasia. *Asian Journal of Andrology*, 12, pp. 690-696.



# **ANEXOS**

## ANEXO I

### Figuras suplementares

**ASTHMA CONTROL QUESTIONNAIRE** ©

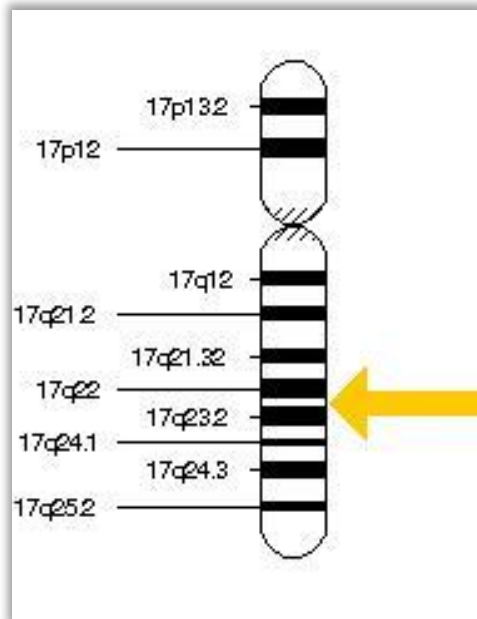
Please answer questions 1–6.

Circle the number of the response that best describes how you have been during the past week

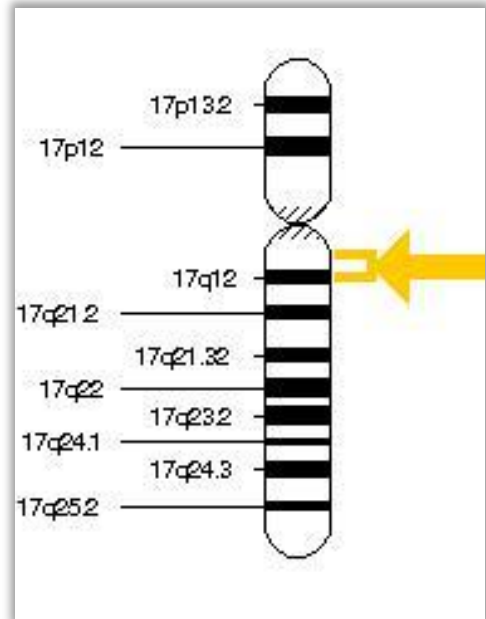
1. On average, during the past week, how often were you woken by your asthma during the night?	0 Never 1 Hardly ever 2 A few minutes 3 Several times 4 Many times 5 A great many times 6 Unable to sleep because of asthma
2. On average, during the past week, how bad were your asthma symptoms when you woke up in the morning?	0 No symptoms 1 Very mild symptoms 2 Mild symptoms 3 Moderate symptoms 4 Quite severe symptoms 5 Severe symptoms 6 Very severe symptoms
3. In general, during the past week, how limited were you in your activities because of your asthma?	0 Not limited at all 1 Very slightly limited 2 Slightly limited 3 Moderately limited 4 Very limited 5 Extremely limited 6 Totally limited
4. In general, during the past week, how much shortness of breath did you experience because of your asthma?	0 None 1 A very little 2 A little 3 A moderate amount 4 Quite a lot 5 A great deal 6 A very great deal
5. In general, during the past week, how much of the time did you wheeze?	0 Not at all 1 Hardly any of the time 2 A little of the time 3 A moderate amount of the time 4 A lot of the time 5 Most of the time 6 All the time
6. On average, during the past week, how many puffs of short-acting bronchodilator (eg. Ventolin) have you used each day?	0 None 1 1–2 puffs most days 2 3–4 puffs most days 3 5–8 puffs most days 4 9–12 puffs most days 5 13–16 puffs most days 6 More than 16 puffs most days
To be completed by a member of the clinic staff	
7. FEV1 pre-bronchodilator: .....	0 >95% predicted 1 95–90% 2 89–80% 3 79–70% 4 69–60% 5 59–50% 6 <50% predicted
FEV1 predicted .....	
FEV1 % predicted .....	
(Record actual values on the dotted lines and score the FEV1 % predicted in the next column)	

©The Asthma Control Questionnaire is copyrighted. It may not be changed, translated or sold (paper or software) without the permission of Elizabeth Juniper.

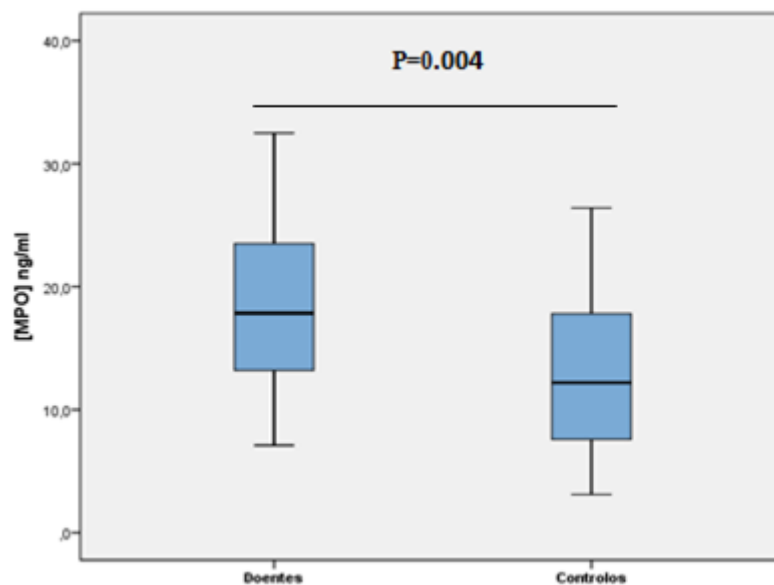
**Figura suplementar 1-** Questionário ACQ (Asthma Control Questionnaire) (adaptado de Juniper *et al.*, 1999).



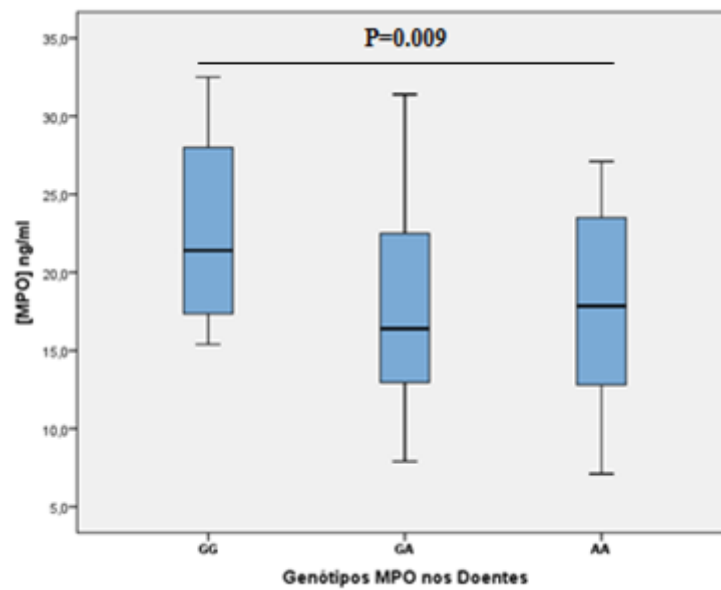
**Figura Suplementar 2** – Localização do gene NOS2A no cromossoma 17 (adaptado de <http://ghr.nlm.nih.gov>).



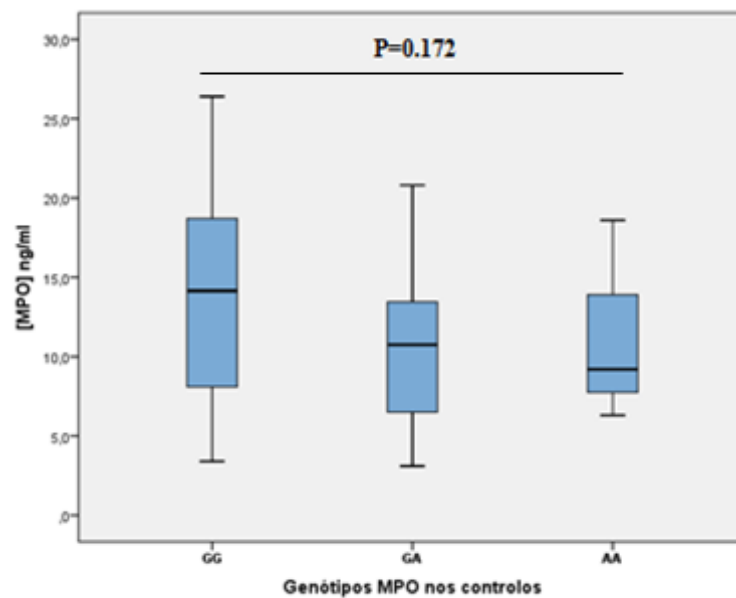
**Figura Suplementar 3** – Localização do gene MPO no cromossoma 17 (adaptado de <http://ghr.nlm.nih.gov>).



**Figura suplementar 4** – Concentração da MPO nas populações dos doentes asmáticos e o grupo controle ( $p=0.004$ ).



**Figura Suplementar 5-** Associação entre o polimorfismo do MPO e a concentração enzimática nos doentes asmáticos ( $p=0.009$ ).



**Figura Suplementar 6-** Associação entre o polimorfismo do MPO e a concentração enzimática no grupo controlo ( $p=0.172$ ).

## ANEXO II

**Tabela Suplementar 1** – Relação dos diferentes polimorfismos com os níveis de controlo de asma e o tipo de asma.

Estudo		Controlado	Não Controlado	p*	Alergia		p*
					Sim	Não	
NOS2 (Exão 16)	CC	48 (64.86%)	17 (65.38%)	0.460	55 (65.48%)	10 (62.5%)	0.595
	CT	22 (29.73%)	9 (34.62%)		25 (29.76%)	6 (37.5%)	
	TT	4 (5.41%)	0		4 (5.41%)	0	
NOS2 (Intrão 16)	GG	35 (49.29%)	7 (29.17%)	0.058	35 (43.75%)	7 (46.67%)	0.882
	GT	22 (30.99%)	14 (58.33%)		30 (37.5%)	6 (40%)	
	TT	14 (19.72%)	3 (12.5%)		15 (18.75%)	2 (13.33%)	
NOS2 (Intrão 20)	GG	22 (20.56%)	11 (25%)	0.721	29 (22.66%)	4 (17.39%)	0.835
	GA	46 (42.99%)	16 (36.36%)		51 (39.84%)	11 (47.83%)	
	AA	39 (36.45%)	17 (38.64%)		48 (37.5%)	8 (34.78%)	
MPO	GG	19 (17.93%)	10 (22.73%)	0.585	27 (21.26%)	2 (8.70%)	0.145
	GA	63 (59.43%)	27. (61.36%)		72 (56.69%)	18 (72.26%)	
	AA	24 (22.64%)	7 (15.91%)		28 (22.05%)	3 (13.04%)	

\*significativo para  $p < 0.05$

## ANEXO III

### **Protocolo Experimental: Extração de DNA pelo método de *Salting-out***

1. O DNA foi extraído de sangue periférico colhido num tubo com anticoagulante EDTA.
2. Transferiu-se 2 mL para um tubo rolhado e graduado de 10 ml.
3. Adicionou-se 1 volume de TKM X-100 tendo o cuidado de adicionar parte deste ao tubo onde a amostra foi colhida de forma a evitar desperdícios de sangue.
4. Adicionou-se 25 µl de IPGEPAL CA 630 por cada ml de sangue, com o objectivo de lisar as células, com consequente libertação de DNA e outros constituintes celulares.
5. O tubo foi agitado 4-5 vezes por inversão vigorosa.
6. Seguiu-se uma centrifugação a 2200 rpm, à temperatura de aproximadamente 4°C e durante 15 min, que deve ser repetida caso o *pellet* formado não adira ao fundo do tubo.
7. O sobrenadante foi rejeitado e ao *pellet* que contém, entre outros constituintes, ao DNA, foi adicionado 1 ml de tampão TKM 1 por cada ml de sangue.
8. Centrifugou-se à mesma temperatura, a 1600 rpm e por um período de 10 min e foram repetidos os passos de rejeição do *pellet* e adição de tampão TKM 1.
9. O passo anterior foi repetido no máximo duas vezes de modo a ser obtido um *pellet* branco evitando perdas excessivas de DNA.
10. Ressuspendeu-se o *pellet* (vortex) na solução de TKM 2 numa proporção de 160 ml por ml de sangue.
11. Adicionou-se 10 µl de SDS 10% por ml de sangue e a mistura foi ressuspensa com o auxílio de um micropipeta. Este reagente dissolve as proteínas ainda existentes em solução.
12. Incubou-se a 55°C por 10 min.
13. Ao fim deste intervalo de tempo o conteúdo do tubo foi transferido para um eppendorf ao qual se juntou 60 µl de NaCl saturado por ml de sangue. Visualizou-se de imediato a precipitação de proteínas existentes na suspensão de DNA que forma uma fase branca opaca distinta de outra completamente transparente (suspensão de DNA).
14. Agitou-se o tubo eppendorf no vortex.
15. Centrifugou-se numa centrífuga de eppendorfs, a 12000 rpm, à temperatura ambiente e por 30 min num processo denominado *salting-out*.

16. Verteu-se o sobrenadante (que contém o DNA) resultante da centrifugação anterior para um tubo de vidro e adicionou-se aproximadamente 2 volumes de etanol absoluto gelado (colocou-se a -20°C cerca de 5 min antes de ser utilizado).
17. O tubo, devidamente selado com parafilme, foi invertido suavemente até precipitação do DNA.
18. Ressuspendeu-se o DNA em 200 µl de Tampão TE previamente colocados no tubo de eppendorf devidamente rotulado e armazenado a 4°C.